

PRISCILA STRAPASSON

Emissão de compostos voláteis por soja geneticamente modificada
resistente ao glifosato e seu efeito nas interações inseto-planta

CURITIBA

2015

PRISCILA STRAPASSON

Emissão de compostos voláteis em soja geneticamente modificada
resistente ao glifosato e seu efeito nas interações inseto-planta

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Entomologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Paulo H. Gorgatti Zarbin

Co-orientadora: Dra. Delia Pinto Zevallos

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Strapasson, Priscila

Emissão de compostos voláteis em soja geneticamente modificada resistente ao glifosato e seu efeito nas interações inseto-planta./ Priscila Strapasson. – Curitiba, 2015.

89 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Paulo Henrique Gorgatti Zarbin

Co-orientadora: Delia Pinto Zevallos

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

1. Soja geneticamente modificada. 2. Glifosato. I. Título II. Zarbin, Paulo Henrique Gorgatti. III. Zevallos, Delia Pinto. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

CDD (20. ed.) 595.77

PRISCILA STRAPASSON

"Emissão de compostos voláteis em soja geneticamente modificada tolerante
ao glifosato e seu efeito nas interações inseto-planta"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em
Ciências", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela
Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin (Orientador)
(UFPR)



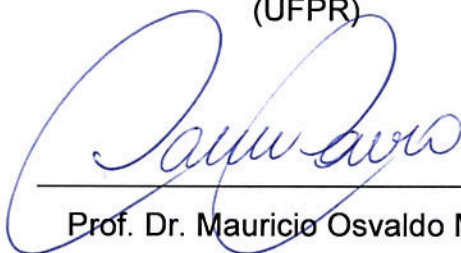
Dr. Adeney Freitas Bueno
(Embrapa Soja/Londrina PR)



Prof. Dr. Martin Francisco Pareja Piaggio
(UNICAMP)



Dra. Marion do Rocio Foerster
(UFPR)



Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura
(UFPR)

Curitiba, 19 de junho de 2015.

Aos meus pais, por todo amor e incentivo

DEDICO

Nada é tão nosso quanto nossos sonhos.

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia, pela oportunidade dada a minha formação profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Prof. Dr. Paulo Zarbin, pela orientação e por me conceder a oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa reconhecido internacionalmente;

À Dra. Delia Pinto Zevallos, pela co-orientação, amizade e pelo exemplo de profissionalismo;

Aos Professores Braulio Santos (UFPR), Adeney de Freitas Bueno (Embrapa CNPSo) e Genésio Tâmara Ribeiro (UFS) pela ajuda com a criação de insetos utilizados nos trabalhos;

Ao Dr. Marco Antonio Root de Oliveira e Franciele Bebbber da COODETEC-Cascavel por toda a assistência e sementes utilizadas na execução dos trabalhos;

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelo exemplo de dedicação à ciência;

Aos amigos químicos Carla Fávaro, Daiane Szczerbowski, Diogo Montes Vidal e Emir Bolzani Saad, pela convivência harmoniosa e toda a ajuda, permitindo que cromatogramas, nanogramas e tantos outros “amas” fossem compreendidos;

À Dra. Camila Borges da Cruz Martins, pela amizade, opinião crítica e ajuda na execução da tese;

À Dra. Sandra Gomes pela ajuda com os bioensaios e por cuidar tão bem dos “nossos” *Meteorus*;

Às amigas Gabriela G. Torrens e Magda Fernanda Paixão, pelos momentos de alegria e descontração;

A minha família, em especial meus pais Lourdes e Augusto, pela compreensão nos momentos de ausência e apoio incondicional;

A Deus, pela vida maravilhosa que nos concede a cada segundo.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	8
GENERAL ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 A produção de soja no Brasil e a incidência de pragas.....	12
1.2 Ocorrência de inimigos naturais na cultura da soja.....	13
1.3 Compostos voláteis induzidos após a herbivoria e perspectivas do seu uso no manejo integrado de pragas.....	14
1.4 Compostos orgânicos voláteis e plantas transgênicas.....	16
2 REFERÊNCIAS.....	18

CAPÍTULO 1 - Soja (*Glycine max*) geneticamente modificada para expressar resistência ao glifosato: mudança no perfil de voláteis pode alterar as interações tritróficas?.....

Resumo	25
Abstract	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 OBJETIVOS	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Plantas de soja.....	29
3.2 Criação de <i>A. gemmatalis</i>	30
3.3 Criação de <i>P. nigrispinus</i>	30
3.4 Ganho de peso de <i>A. gemmatalis</i> em soja transgênica e isogênica	30
3.5 Preferência de oviposição de <i>A. gemmatalis</i> em soja transgênica e isogênica	30
3.6 Coleta e análise de voláteis	31
3.7 Preferência de odor por <i>P. nigrispinus</i>	31
3.8 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	32
4.1 Ganho de peso de <i>A. gemmatalis</i> em soja transgênica e isogênica	32
4.2 Preferência de oviposição de <i>A. gemmatalis</i> em soja transgênica e isogênica	33
4.3 Emissão de voláteis por plantas de soja	33
4.4 Preferência de odores por <i>P. nigrispinus</i>	39
5 DISCUSSÃO	41
6 REFERÊNCIAS	43

CAPÍTULO 2 – Mudança no perfil de voláteis emitidos por soja transgênica tolerante ao glifosato após a herbivoria influencia o comportamento de *Meteorus rubens* (Hymenoptera: Braconidae).....

Resumo	50
Abstract	51
1 INTRODUÇÃO	52
2 OBJETIVOS	54
2.1 Geral	54
2.2 Específicos	54
3 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 Plantas de soja.....	54

3.2 Criação de <i>C. includens</i>	54
3.3 Manutenção de <i>M. rubens</i> em laboratório.....	55
3.4 Ganho de peso de <i>C. includens</i> em soja transgênica e isogênica	55
3.5 Coleta e análise de voláteis.....	55
3.6 Preferência de odores por <i>M. rubens</i>	56
3.7 Análise estatística.....	57
4 RESULTADOS	57
4.1 Ganho de peso de <i>C. includens</i> em soja transgênica e isogênica	57
4.2 Emissão de voláteis	57
4.3 Preferência de <i>M. rubens</i> aos voláteis de soja.....	62
5 DISCUSSÃO	64
6 REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO 3 – Pistas olfativas no forrageamento de <i>Trichogramma pretiosum</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae): o papel dos feromônios contra COVs induzidos por oviposição	
Resumo	71
Abstract	72
1 INTRODUÇÃO	73
2 OBJETIVOS	75
2.1 Geral	75
2.2 Específicos	75
3 MATERIAL E MÉTODOS	75
3.1 Obtenção de plantas	75
3.2 Criação de <i>S. frugiperda</i>	75
3.3 Manutenção de <i>T. pretiosum</i> em laboratório.....	75
3.4 Coleta e análise de voláteis.....	76
3.5 Preferência de <i>T. pretiosum</i> aos voláteis de soja e componente majoritário do feromônio sexual de <i>S. frugiperda</i>	76
3.6 Análises estatísticas.....	77
4 RESULTADOS	77
4.1 Voláteis de soja liberados após a oviposição de <i>S. frugiperda</i>	77
4.2 Preferência de <i>T. pretiosum</i> aos voláteis de soja e composto majoritário do feromônio sexual de <i>S. frugiperda</i>	81
5 DISCUSSÃO	81
6 REFERÊNCIAS	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
REFERÊNCIAS GERAIS.....	89

RESUMO GERAL

Após a herbivoria, plantas ativam vias bioquímicas que resultam em uma série de respostas de defesa, incluindo a emissão de uma diferente mistura de compostos orgânicos voláteis (COVs), aumentando o recrutamento de predadores e parasitoides que controlam o herbívoro que está atacando a planta. A manipulação genética de uma determinada característica que melhore as variedades de plantas agrícolas pode afetar outras características, como um resultado de possíveis efeitos pleiotrópicos de inserção, mutações que por sua vez podem afetar a interação da planta com outros organismos. Sabe-se que ocorrem mudanças nas emissões de COVs induzidos por herbívoros em plantas transgênicas que expressam tolerância a insetos (principalmente plantas *Bt*), não só como resultado do comportamento modificado dos insetos, mas também como resultado da alteração da alocação de recursos na planta. Plantas transgênicas tolerantes ao glifosato expressam uma variante da enzima EPSPS (5-enol-piruvil chiquimato-3-fosfato sintase) que é insensível ao herbicida glifosato. Esta enzima é essencial em vias metabólicas que resultam na síntese de aminoácidos e de metabólitos secundários envolvidos na defesa da planta. Neste trabalho foi investigado se as emissões constitutivas de uma linha de soja transgênica e COVs induzidos pela herbivoria de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidæ) e *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidæ) diferem das emitidas pela cultivar isogênica (não modificada) e se as alterações podem interferir no comportamento de forrageamento do percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidæ) e do parasitoide gregário *Meteorus rubens* (Hymenoptera: Braconidæ), respectivamente. Além disso, foram realizados testes para verificar o ganho de peso em lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica ou isogênica e preferência de oviposição de fêmeas acasaladas. Também foi avaliado se os voláteis emitidos após a oviposição de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidæ) são diferentes em plantas transgênicas e isogênicas e o efeito no comportamento do parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidæ). Houve um ganho de peso significativamente maior em lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com folhas de soja transgênica e fêmeas desta espécie preferiram ovipositar em plantas de soja transgênica. Não foi observada diferença no peso final de lagartas da espécie *C. includens* alimentadas com folhas de soja transgênica ou isogênica. As análises de GC-MS mostraram diferenças nas emissões de COVs induzidos por herbivoria e que há influência dos genótipos. O efeito do genótipo em vários compostos individuais parece dever-se principalmente ao efeito sobre as

emissões induzidas por herbívoros. Emissões maiores foram medidas na linha transgênica do que na isogênica após a herbivoria de ambas espécies. Ninfas de *P. nigrispinus* preferiram os odores de plantas isogênicas danificadas em relação a plantas controle, entretanto, não discriminaram odores de plantas danificadas e controle transgênicas. Além disso, não foi observada preferência de ninfas por odores de plantas danificadas de qualquer uma das linhas em relação à outra. Fêmeas acasaladas da espécie *M. rubens* foram capazes de discriminar entre os odores de plantas danificadas ou não pela herbivoria de *C. includens*, mas preferiram os odores emitidos por plantas transgênicas danificadas pela herbivoria em comparação com a isogênica também danificada. Com relação aos voláteis induzidos pela oviposição de *S. frugiperda*, não foram detectadas mudanças no perfil de voláteis de soja transgênica ou isogênica e estes voláteis não atraíram fêmeas do parasitoide *T. pretiosum*. Foi observado que estes parasitoides foram atraídos pelo composto majoritário do feromônio sexual sintético de *S. frugiperda*, comprovando que, de fato, a localização do hospedeiro, neste caso, se dá através de infoquímicos liberados pela fase adulta do hospedeiro e não por voláteis de plantas induzidos por oviposição.

Com base nos resultados deste estudo conclui-se que, apesar de uma maior emissão de voláteis por plantas transgênicas, a nova mistura emitida não permitiu que os predadores discriminassem entre plantas transgênicas e isogênicas danificadas, entretanto, parasitoides foram capazes de discriminar entre as duas cultivares. Isso pode ter ocorrido devido a características comportamentais particulares destes diferentes inimigos naturais ou pela não atratividade da mistura dos voláteis emitidos por soja transgênica. É importante lembrar que estes resultados podem variar de acordo com os sistemas estudados e, portanto, este trabalho abre possibilidades para novos estudos de ecologia química em sistemas tritróficos para avaliar o efeito das plantas transgênicas tolerantes ao glifosato.

GENERAL ABSTRACT

Following herbivory, plants activate biochemical pathways that result in a series of defense responses, including the emission of a different mixture of organic volatile compounds (VOCs), which increases the recruitment of predators and parasites that control the herbivore attacking the plant. The genetic manipulation of a specific characteristic that enhances the varieties of agricultural plants may affect other characteristics as a result of possible pleiotropic effects by insertions mutations which may effect the interaction of the plant with other organisms. Changes occur in VOC emissions induced by herbivores on transgenic plants that express tolerance to insects (principally *Bt* plants), not just as a result of the modified insect behavior, but also as a result of change in resource allocation in the plant. Glyphosate tolerant transgenic plants express a variant of the EPSPS enzyme (5-enol-pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase) that is insensitive to the herbicide glyphosate. This enzyme is essential in the metabolic pathways, which result in synthesis of amino acids and secondary metabolites involved in plant defense. This study investigated whether constituent emissions and VOCs induced by herbivory from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidæ) and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidæ) in a line of transgenic soybean differed from those emitted by an isogenic cultivar (not modified) and if these changes may interfere in the foraging behavior of the predator insects *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidæ) and the gregarious parasitoid *Meteorus rubens* (Hymenoptera: Braconidæ), respectively. Additionally, tests were conducted to verify the weight gain of caterpillars fed with either transgenic or isogenic soybean leaves, as well as oviposition preference of mated females. This study also evaluated if the volatile emissions of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidæ) after oviposition are different in transgenic and isogenic plants, and the effect on the behavior of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidæ). There was a significantly greater weight gain in *A. gemmatalis* caterpillars fed on transgenic soybean leaves and females of this species preferred to oviposit on transgenic soybean plants. There was no difference in the final weight of caterpillars from the species *C. includens* fed on transgenic or isogenic soybean leaves. The GC-MS analyzes showed differences in VOC emissions induced by herbivores and that there is influence from genotypes. The effect of genotypes on various individual compounds seems to be due mainly to the effect on emissions induced by herbivores.

Higher emissions were measured in the transgenic line than the isogenic line after herbivory of both species. Nymphs of *P. nigrispinus* preferred the odors from damaged isogenic plants in relation to control plants, however, they did not discriminate between odors from damaged plants and transgenic control. Furthermore, there was no preference by nymphs for damaged plant odors from either line relative to the other. Mated females of the species *M. rubens* were capable of discriminating between odors from damaged plants or non-damaged plants by *C. includens* herbivory, but preferred odors emitted by herbivory damaged transgenic plants in comparison to also damaged isogenic plants. In relation to the volatile compounds induced by *S. frugiperda* oviposition, no changes were detected in the volatile compound profile of transgenic or isogenic soybean and these volatile compounds did not attract females from the parasitoid *T. pretiosum*. It was observed that these parasitoids were attracted by the major compound from the sex pheromone of *S. frugiperda*, proving that, in fact the location of the host, in this case, is through infochemicals released by the host's adult phase and not by volatile plant compounds induced through oviposition.

According to the results we conclude that, even with a greater emission of volatile compounds by transgenic plants, the new mixture emitted did not allow predators to discriminate between damaged transgenic or isogenic plants, however, parasitoids were capable of discriminating between the two cultivars. This may be due to specific behavioral characteristics from these different natural enemies or by the non-attractive mixture of volatile compounds emitted by transgenic soybean. Importantly, these results may vary according to the studied systems, and thus, this study opens up possibilities for new studies in chemical ecology of tritrophic systems to evaluate the effect of transgenic plants resistant to glyphosate.

1.INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A PRODUÇÃO DE SOJA NO BRASIL E A INCIDÊNCIA DE PRAGAS

O Brasil se tornou na safra 2014/15 o maior exportador mundial de soja. O país produziu no último ciclo mais de 96 milhões de toneladas do grão, representando um incremento de 11,7% em relação ao montante produzido no ano anterior e exportou aproximadamente 47 milhões de toneladas (CONAB 2015).

Qualquer sistema de produção em monocultura, como é o caso da soja, pode levar à ocorrência de pragas, devido à grande oferta e concentração de alimento e a eliminação de fontes alternativas de alimento para inimigos naturais das pragas. Assim, grandes prejuízos têm sido causados aos plantios de soja por insetos e fungos, o que tem levado ao uso indiscriminado de produtos químicos para o controle destas pragas. A utilização de agrotóxicos em soja é realizada de maneira inadequada, com aplicações preventivas e com misturas de diferentes produtos, muitas vezes de amplo espectro (Sosa-Gómez et al. 2003). Esta prática tem levado a um desequilíbrio ambiental, acarretando problemas sérios como ressurgência de pragas, resistência dos insetos aos inseticidas e eliminação de inimigos naturais. Na ausência de controle biológico natural, pragas antes consideradas secundárias, passam a causar danos e preocupar os sojicultores, com necessidade muitas vezes, de controle (Bueno et al. 2007).

Dentre os maiores causadores de prejuízo à cultura da soja estão as lagartas desfolhadoras. Destaca-se *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ), conhecida como lagarta-da-soja, por sua frequência e abundância em todas as regiões produtoras de soja (Moscardi et al. 2012), que pode causar 100% de desfolhamento caso não seja controlada. Esta praga, juntamente com o complexo de percevejos, é responsável por 90% das aplicações de inseticidas na cultura (Moscardi e Sosa-Gomez 1992).

Chrysodeixis (= *Pseudoplusia*) *inclusens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidæ) foi considerada praga secundária até 2003, desde então se tornou de grande destaque na cultura da soja, devido ao desequilíbrio causado pelo manejo inadequado das plantações (Bueno et al. 2007). De acordo com Sosa-Gómez et al. (2003), as aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem estariam contribuindo para a diminuição da incidência de fungos entomopatogênicos, como *Metharyzium rileyi*, e dos pertencentes ao grupo dos Entomophthorales, como *Pandora* sp., e *Zoophthora* sp. que mantinham a população do inseto abaixo do nível de dano.

Spodoptera frugiperda (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga polífaga que se alimenta de um grande número de hospedeiros (Luginbill 1928). Ainda que apresente preferência alimentar por plantas da família das gramíneas como milho, milheto, trigo, sorgo, arroz e cana-de-açúcar, também ataca plantas de outras famílias botânicas como alfafa, feijão, amendoim, batata, batata doce, repolho, espinafre, tomate, couve, abóbora, soja e algodoeiro (Ali et al. 1989; Cruz 1995; Pogue 2002). O ataque de *S. frugiperda* na cultura da soja é recente e consequentemente seu controle tem sido feito principalmente com inseticidas químicos (Valicente e Fonseca 2004). Nessa cultura, alimentam-se das folhas, cortam o caule tenro de plântulas provocando danos em áreas extensivas, com necessidade de replantio (Gassen 1996). Também pode consumir a casca na base de plantas de soja, causando sintomas que podem ser confundidos com os de outras pragas (Cruz et al. 1997).

1.2 OCORRÊNCIA DE INIMIGOS NATURAIS NA CULTURA DA SOJA

O controle biológico natural é uma alternativa para a diminuição ou eliminação do uso de inseticidas no controle de pragas (Altieri 1989). A ocorrência de inimigos naturais pode ser aumentada pela adoção de sistemas conservacionistas de manejo do solo (Stinner e House 1990) e pela consorciação de culturas, sendo esta prática importante para aumentar a diversidade desses insetos (Altieri et al. 1989).

Podisus nigrispinus (Dallas, 1851) é um percevejo predador bastante comum em plantações de soja e é encontrado nesta cultura durante todo o ciclo fenológico. Na ausência de presas, podem se alimentar de substratos vegetais, sendo capazes de se estabelecer e manter a população mesmo quando a densidade de pragas é baixa (Zanuncio et al. 1997). *P. nigrispinus* se alimenta de ovos e ninfas de percevejos fitófagos (Saini 1994) e lagartas desfolhadoras como *A. gemmatilis* (Corrêa-Ferreira 1980) e *C. includens* (Moraes et al. 1991). Apesar da sua importância em programas de controle biológico, poucos estudos têm investigado o seu potencial de aplicação em campo (Moscardi et al. 2012).

Meteorus rubens (Nees, 1811) é um endoparasita gregário cosmopolita que pode se desenvolver em várias espécies de noctuídeos (Zaki et al. 1995). Apesar do baixo número de estudos que abordam aspectos biológicos e comportamentais desta espécie na região Neotropical, este parasitoide é comumente encontrado parasitando *C. includens* em campos de soja (Strapasson et al. observações pessoais).

Trichogramma pretiosum (Riley, 1879) possui inúmeros hospedeiros, principalmente da Ordem Lepidoptera (Pinto 1999). Estes parasitoides são muito estudados e amplamente utilizados em programas de controle biológico por sua eficiência e facilidade de criação em laboratório. Por ser uma espécie exclusivamente endoparasitoide de ovos, o parasitismo por esta espécie impede que os seus hospedeiros atinjam a fase de larva, principal causadora de danos às culturas (Haji et al. 1995).

1.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS INDUZIDOS APÓS A HERBIVORIA E PERSPECTIVAS DO SEU USO NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS

As plantas apresentam diferentes mecanismos de defesa contra insetos herbívoros (Arimura et al. 2005). O mecanismo de defesa pode ser do tipo constitutivo, não dependendo do dano causado para expressá-lo, ou induzido, que depende da injúria para ocorrer (Karban e Baldwin 1997). As defesas podem ser ainda do tipo diretas, influenciando o desenvolvimento do herbívoro, ou indiretas, que não agem diretamente sobre os insetos, mas atuam no recrutamento de inimigos naturais dos mesmos (Dicke et al 1990).

Uma das formas de defesa indireta das plantas é a liberação de uma mistura de compostos orgânicos voláteis (COVs) induzidos após a herbivoria. Através de COVs, predadores e parasitoides são orientados para plantas que estão sendo atacadas por sua presa/hospedeiro (Arimura et al. 2009). A mistura de voláteis induzidos pode variar quantitativa ou qualitativamente, entretanto, uma vez que diferentes espécies de plantas podem emitir os mesmos compostos, tem-se proposto que a orientação olfativa dos insetos está baseada em variações na razão dos componentes (Bruce 2005, De Boer e Dicke 2005).

Os COVs são classificados em diferentes grupos químicos, sendo os principais pertencentes aos voláteis de folhas verde (VFFVs), terpenoides, benzenoides e fenilpropanoides (Dudareva et al. 2004). A liberação destes voláteis é regulada principalmente pelos fitohormônios ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno e, dependendo da guilda alimentar do herbívoro, diferentes vias de sinalização são ativadas (Thaler et al. 2012).

A identificação e manipulação de compostos químicos que medeiam a interação das atividades entre plantas, herbívoros e inimigos naturais oferecem uma gama de oportunidades para o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas que sejam menos agressivas ao meio ambiente. A utilização de voláteis de plantas no manejo

integrado de pragas é uma estratégia adicional e ecologicamente sustentável no controle de pragas (Arab e Bento 2006). Entretanto, é necessário um conhecimento profundo dos diferentes voláteis induzidos e como eles são regulados. O conhecimento destes voláteis é importante para o desenvolvimento de programas de controle biológico bem sucedidos, visto que sua manipulação poderia melhorar a eficiência dos agentes no campo. As evidências de que semioquímicos podem modificar o comportamento dos parasitoides de insetos tem inspirado pesquisadores a explorar a utilização destes compostos para conservar e/ou aumentar a eficácia destes organismos em sistemas de cultivo (Pickett et al. 1997, Khan et al. 2008), por meio da manipulação da abundância e da distribuição dos inimigos naturais no campo.

Os avanços nas pesquisas em química analítica, que conduziram à identificação e síntese de vários de compostos semioquímicos torna crescente o conhecimento de como o uso de ecologia química pode melhorar a eficácia de parasitoides de insetos em programas de controle biológico. As estratégias baseadas em voláteis de plantas representam uma abordagem relativamente nova, sendo mais promissoras as aplicações envolvendo o uso de compostos voláteis de plantas induzidos por herbívoros visando atrair e conservar os inimigos naturais na proximidade das culturas a serem protegidas. No entanto, a previsão de utilização destas técnicas está muito aquém do desenvolvimento de aplicações em campo de feromônios, principalmente devido à falta de estudos em campo que comprovem sua eficiência. Na última década, foram realizados estudos demonstrando que a liberação de voláteis induzidos por herbívoros pode realmente aumentar ou conservar a eficácia de diferentes parasitoides em culturas como algodão (Xu et al. 2008), milho (Mérey et al. 2011) e soja (Zhu e Park 2005).

Plantas geneticamente modificadas tem se mostrado como novas oportunidades para aplicações de semioquímicos. Por exemplo, as plantas podem ser modificadas para produzir (*E*)- β -farneseno de forma a imitar o feromônio de alarme de pulgões, a fim de aumentar a população de predadores e parasitoides destes insetos (Yu et al. 2012). Apesar do potencial de utilização desta técnica no manejo integrado de pragas, deve-se levar em consideração o fato de que a evolução tem favorecido a indução de defesas para reduzir custos metabólicos e ecológicos das defesas constitutivas. Portanto, tornar a presença destes voláteis constante pode não somente demandar um alto gasto de energia para as plantas como também condicionar os inimigos naturais a associar estes compostos à ausência do hospedeiro, uma vez que a planta passa a emití-los sem que haja o dano do herbívoro.

1.4 COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E PLANTAS TRANSGÊNICAS

O desenvolvimento da biologia molecular e os avanços na biotecnologia têm permitido a manipulação genética de plantas, visando introduzir genes que expressem características desejáveis. Durante os últimos anos, vários estudos têm-se centrado sobre o impacto do gene *Bt* sobre as emissões de COVs de planta e os possíveis efeitos sobre herbívoros e carnívoros (Yan et al. 2004, Turlings et al. 2005, Dean e De Moraes 2006, Himanen et al. 2009). Mais recentemente, alguns estudos também avaliaram os efeitos das plantas modificadas para expressar resistência a *Venturia inaequalis*, agente causal da doença sarna da macieira, na indução de emissão de voláteis e a resposta de um parasitoide aos COVs induzidos por herbívoros (Vogler et al. 2009, Vogler et al. 2010). No entanto, nenhum estudo avaliou a ecologia de interações mediadas por COVs entre plantas geneticamente modificadas para expressar resistência ao glifosato [(N-(fosfonometil) Gli] e os níveis tróficos superiores.

O advento da soja transgênica, tolerante ao herbicida Roundup Ready® (RR), revolucionou o mercado mundial de soja, sendo autorizado seu cultivo definitivo no Brasil, em 2005, com a nova Lei de Biossegurança. A busca pelo aumento de produtividade, com consequente redução de custos, facilidade de manejo de plantas indesejáveis e menor efeito residual do novo evento promoveu o rápido crescimento da área cultivada com soja RR no mundo. No Brasil, essa cultura foi responsável por 92,4% do total de área plantada da oleaginosa, o equivalente a 26,9 milhões de hectares na safra 2013/2014 (CONAB 2013).

O evento 40-3-2 da Monsanto recebeu o gene CP4 EPSPS, que codifica a enzima CP4 EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), presente na bactéria do solo *Agrobacterium* sp. cepa CP4. Para obtenção do gene, foi usada a técnica de transformação por aceleração de partículas metálicas recobertas com material genético, denominada biobalística. Com a introdução da sequência CP4 EPSPS no genoma de linhagens comerciais de soja, a qual confere tolerância ao ingrediente ativo glifosato, é produzida a proteína CP4 EPSPS, enzima que participa da biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas e microrganismos. No caso de linhagens convencionais, a inibição dessa enzima pelo glifosato, presente na via do chiquimato (Figura 1), causa deficiência na produção de aminoácidos essenciais e consequente morte das plantas, o que não ocorre nas linhagens de soja modificadas geneticamente. A via do chiquimato é responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como fenilalanina, triptofano e tirosina (Buchanan et al. 2000). Estes aminoácidos, além de constituírem

proteínas importantes para o desenvolvimento da planta, podem participar da via dos fenilpropanoides, principal caminho para a síntese de compostos fenólicos, dentre estes os monolignóis, precursores da lignina. A síntese desta molécula é um processo complexo, que envolve inúmeras etapas enzimáticas que compõem o metabolismo secundário das plantas (Strack 1997). O triptofano é o precursor do indole que é induzido mediante herbivoria em algumas espécies de plantas, incluindo o milho e soja (Turlings et al. 2005, Rostás e Eggert 2008). L-fenilalanina é o precursor de fenilpropanoides voláteis, tais como o salicilato de metila (MeSa), que é emitido por plantas de soja (Rostás e Eggert 2008).

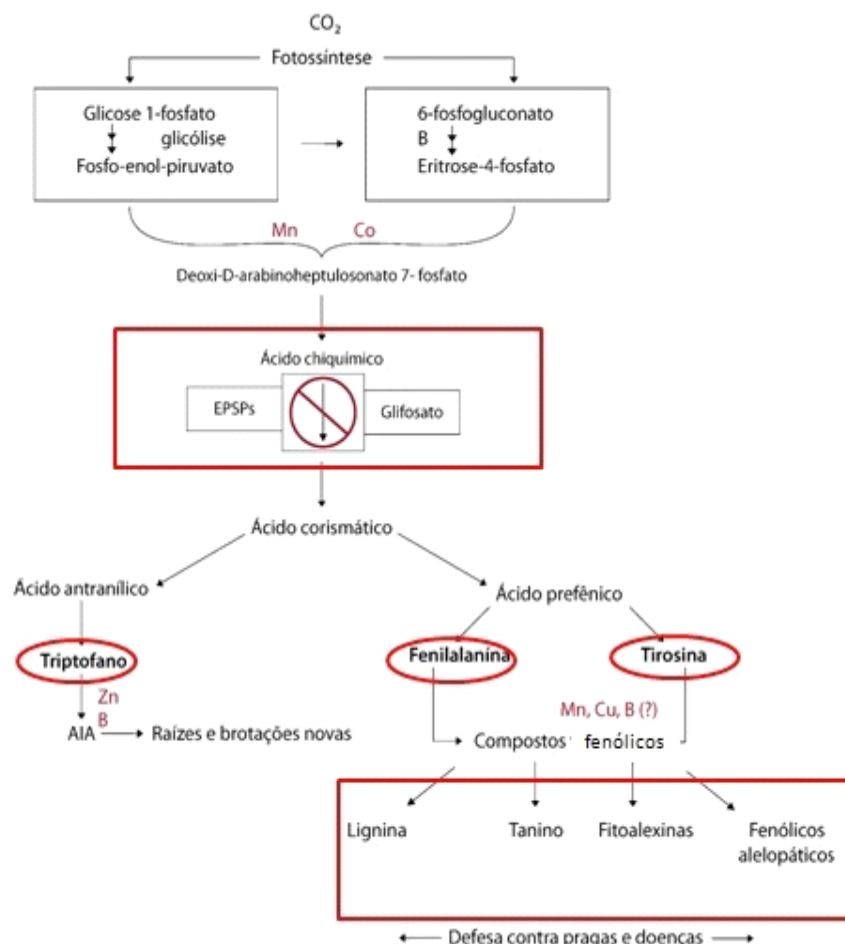


Figura 1. Ação do herbicida glifosato na rota biossintética do ácido chiquímico (adaptado de Graham e Webb 1991)

Diante da possibilidade de modificação dos voláteis emitidos após a herbivoria por plantas geneticamente modificadas, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a modificação genética da soja tolerante ao herbicida glifosato altera interações multitróficas mediadas por COVs. Para isso, a tese foi dividida em 3 capítulos. No primeiro capítulo foi avaliado se a modificação genética da soja RR altera as relações mediadas por COVs entre o herbívoro desfolhador *A.gemmatalis* e o predador generalista *P. nigrispinus*. No segundo capítulo foi analisado se as relações tritróficas entre soja RR, o herbívoro generalista *C. includens* e o endoparasitoide gregário *M. rubens* são afetadas pela modificação genética que confere resistência da soja RR ao herbicida glifosato. Por fim, no terceiro capítulo foi investigado se os voláteis emitidos após a oviposição de *S. frugiperda* são afetados pela modificação genética da soja RR e o efeito no comportamento do parasitoide de ovos *T. pretiosum*.

2. REFERÊNCIAS

Ali A, Luttrell R G, Pitre H N, Davis F M (1989) Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. Environ Entomol 18 (5): 881-885.

Altieri M A (1989) Agroecologia: as bases científicas da agricultura alternativa. Rio de Janeiro: PTA/FASE.

Arab A, Bento JMS (2006) Plant Volatiles: New Perspectives for Research in Brazil. Neotr Entomol 35 (2): 151-158.

Arimura C, Kost G, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. Bioch et Biophys Acta 734(2): 91-111.

Arimura G, Matsui K, Takabayashi J (2009) Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. Plant Cell Physiol. 50: 911-923.

Bruce TJA, Wadhams LJ, Woodcock CM (2005) Insect host location: a volatile situation. Trends Plant Sci 10: 269-274.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.

Bueno RCOF, Parra JRP, Bueno AF, Moscardi F, Oliveira J R G, Camillo M F (2007) Sem barreira. Rev Cultivar 93: 12-15.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento- Divulgação de safras 2015. Disponível em www.conab.gov.br. Acesso em 21/07/2015.

Corrêa-Ferreira B S (1980) Sampling *Epinotia aporema* on soybean. In: Kogan M, Herzog D C (Ed.). Sampling methods in soybean entomology. Springer-Verlag, 374-381.

Cruz I (1995) A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45p. (Circular Técnica 21).

Cruz I, Figueiredo M L C, Gonçalves E P, Lima D A N, Diniz E E (1997) Efeito da idade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no desempenho do parasitoide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e consumo foliar por lagartas parasitadas e não parasitadas. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 26(2): 229-234.

De Boer JG, Dicke M (2004) The role of methyl salicylate in prey searching behavior of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. J Chem Ecol 30: 255-271.

Dean JM, De Moraes CM (2006) Effects of genetic modification on herbivore-induced volatiles from maize. J Chem Ecol 32: 713-724.

Dicke M, Sabelis M W, Takabayashi J, Bruin J, Posthumus M A (1990) Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. J Chem Ecol 16: 3091-3118.

Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J (2004) Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiol 135:1893-1902.

Gassen D N (1996) Manejo de pragas associadas à cultura milho. Passo Fundo: Ideia Norte p. 85-104.

Graham R D, Webb M J (1991) Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: Mortwedt J J, Cox F R, Shuman L M, Welch R M (Eds). Micronutrients in agriculture. Madison: Soil Science Society of America, Inc. p.329-370.

Haji F N P, Freire L C L, Roa F G, Silva C N, Souza Junior M M, Silva M I V (1995) Manejo integrado de *Scrobipalpuloides absoluta* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) no Submédio São Francisco. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 24(3): 587-591.

Himanan SJ, Nerg AM, Nissinen A, Pinto DM, Stewart CN Jr, Poppy GM, Holopainen JK (2009) Effects of elevated carbon dioxide and ozone on volatile terpenoid emissions and multitrophic communication of transgenic insecticidal oilseed rape (*Brassica napus*). New Phytol 181: 174-186.

Karban R, Baldwin IT (1997) Induced Responses to Herbivory. University of Chicago Press, Chicago.

Khan ZR, Midega CAO, Njuguna EM, Arnudavi DM, Wanyama JM, Pickett JA (2008) Economic performance of the ‘push-pull’ technology for stemborer and Striga control in smallholder farming systems in western Kenya. Crop Prot 27: 1084-1097.

Luginbill P (1928) The fall armyworm. Tech Bull US Depart Agric 34: 1-91.

Mérey G, Veyrat N, Mahuku G, Valdez R L, Turlings T C J, D’Alessandro M (2011) Dispensing synthetic green leaf volatiles in maize fields increases the release of sesquiterpenes by the plants, but has little effect on the attraction of pest and beneficial insects. Phytochem 72: 1838.

Moraes RR, Loeck A E, Belarmino L C (1991) Inimigos naturais de *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) e de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em soja no Rio Grande do Sul. *Pesq Agropec Brasil* 26:57-64.

Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffman-Campo CB, Pomari AF, Corso IV, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffman-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (Ed.). *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Brasília: Embrapa, pp. 213-309.

Moscardi F, Sosa-Gómez DR (1992) Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: Copping IG, Green MB, Reeds RT (Eds.). *Pest management in soybean*. London: Elsevier Applied Science, pp. 98-109.

Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1997) Developing sustainable pest control from chemical ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 64:149-156.

Pinto J D (1999) Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Washington: Entomolog Soc Washington, 287p.

Pogue G M (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem Am Entomol Soc* 43: 1-202.

Rostás M, Eggert K (2008) Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis. *Chemoecology* 18: 29 – 38.

Saini E D (1994) Aspectos morfológicos y biológicos de *Podisus connexivus* Bergroth (Heteroptera: Pentatomidae). *Rev Soc Entomol Argentina* 53: 35-42.

Sosa-Gómez DR, Delpin KE, Moscardi F, Nozaki MH (2003) The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. *Neotr Entomol* 32(2): 287-291.

Stinner BR, House GJ (1990) Arthropods and other invertebrates in conservation-tillage agriculture. *An Rev Entomol* 35: 299-318.

Strack D (1997) Phenolic metabolism In: Dey PM, Harborne JB (eds) *Plant Biochemistry*. London: Academic press, pp. 387-416.

Thaler J S, Humphrey P T, Whiteman N K (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* 17: 260–270.

Turlings TC, Jeanbourquin PM, Held M, Degen T (2005) Evaluating the induced-odour emission of a Bt maize and its attractiveness to parasitic wasps. *Transgenic Res* 14: 807-816.

Valicente F H e Fonseca M M (2004) Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 3(1): 21-29.

Vogler U, Rott AS, Gessler C, Dorn S (2009) Terpene-mediated parasitoid host location behavior on transgenic and classically bred apple genotypes. *J Agric Food Chem* 57: 6630-6635.

Vogler U, Rott AS, Gessler C, Dorn S (2010) Comparison between volatile emissions from transgenic apples and from two representative classically bred apple cultivars. *Transgenic Res* 19: 77-89.

Xu W H, Liu B, Wang R M, Zheng Y P, Zhang Y, Li X G (2008) Effects of transgenic *Bt* cotton on insect community in cotton fields of coastal agricultural area of Jiangsu province. *J Ecol and Rural Envir* 24: 32–38.

Yan F, Bengtsson M, Anderson P, Ansebo L, Xu C, Witzgall P (2004) Antennal response of cotton bollworm (*Helioverpa armigera*) to volatiles in transgenic Bt cotton. *J Appl Entomol* 128: 354-357.

Yu XD, Pickett J, Ma YZ, Bruce T, Napier J, Jones HD (2012) Metabolic engineering of plant-derived (*E*)-b-farnesene synthase genes for a novel type of aphid-resistant genetically modified crop plants. *J Integr Plant Biol* 54: 282–299.

Zaki F N, Awadallah K T, Gesraha M A, Ibrahim M M A (1995) Attractiveness of the parasitoid, *Meteorus rubens* (nees) to hexane-extract of *Agrotis ipsilon* (hufn.). *J Insec Pest* 68 (6): 140-141.

Zanuncio J C, Torres J B, Bernardo D L, De Clercq P (1997) Effects of prey switching on nymphal development of four species of predatory stinkbugs. *Med Fac Landbouww Univ Gent* 62: 483-490.

Zhu J, Park K C (2005). Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *J Chem Ecol* 31:1733-1746.

CAPÍTULO 1

SOJA (*Glycine max*) GENETICAMENTE MODIFICADA PARA EXPRESSAR RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO: MUDANÇA NO PERFIL DE VOLÁTEIS PODE ALTERAR AS INTERAÇÕES TRITRÓFICAS?

SOJA (*Glycine max*) GENETICAMENTE MODIFICADA PARA EXPRESSAR RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO: MUDANÇA NO PERFIL DE VOLÁTEIS PODE ALTERAR AS INTERAÇÕES TRITRÓFICAS?

Resumo: Após a herbivoria, plantas ativam vias bioquímicas que resultam em uma série de respostas de defesa, incluindo a emissão de uma diferente mistura de compostos orgânicos voláteis (COVs), aumentando o recrutamento de predadores e parasitoides que controlam o herbívoro que está atacando a planta. A manipulação genética de uma determinada característica que melhore as variedades de plantas agrícolas pode afetar outras características, como um resultado de possíveis efeitos pleiotrópicos de inserção, mutações que por sua vez podem afetar a interação da planta com outros organismos. Sabe-se que ocorrem mudanças nas emissões de COVs induzidos por herbívoros em plantas transgênicas que expressam tolerância a insetos (principalmente plantas *Bt*), não só como resultado do comportamento modificado dos insetos, mas também como resultado da alteração da alocação de recursos. Plantas transgênicas tolerantes ao glifosato expressam uma variante da enzima EPSPS (5-enol-piruvil chiquimato-3-fosfato sintase) que é insensível ao herbicida glifosato. Esta enzima é essencial em vias metabólicas que resultam na síntese de aminoácidos e de metabólitos secundários. Neste trabalho foi investigado se as emissões constitutivas de uma linha de soja transgênica e COVs induzidos por *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Erebidæ) diferem das emitidas pela cultivar isogênica (não modificada) e se as alterações podem interferir no comportamento de forrageamento do percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). Além disso, foram realizados testes para verificar o ganho de peso em lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica ou isogênica e preferência de oviposição de fêmeas acasaladas. Houve um ganho de peso significativamente maior em lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica e fêmeas de *A. gemmatilis* também preferiram ovipositar em plantas de soja transgênica. As análises de GC-MS mostraram diferenças nas emissões de COVs induzidos por herbivoria e que há influência dos genótipos. O efeito do genótipo em vários compostos individuais parece dever-se principalmente ao efeito sobre as emissões induzidas por herbívoros. Emissões maiores foram medidas na linha transgênica do que na isogênica após a herbivoria. Ninfas de *P. nigrispinus* preferiram os odores de plantas isogênicas danificadas em relação a plantas controle, entretanto, não discriminaram odores de plantas danificadas e controle transgênicas. Além disso, não foi observada preferência de ninfas por odores de plantas danificadas de qualquer uma das linhas em relação à

outra. Os resultados deste estudo permitem concluir que, apesar de uma maior emissão de voláteis por plantas transgênicas, a nova mistura emitida não permitiu que o predador fizesse discriminação entre plantas transgênicas e isogênicas danificadas. Isso pode ter ocorrido devido a características comportamentais particulares destes predadores ou pela não atratividade da mistura dos voláteis emitidos por soja transgênica. É importante lembrar que estes resultados podem variar de acordo com os sistemas estudados e, portanto, este trabalho abre possibilidades para novos estudos de ecologia química em sistemas tritróficos para avaliar o efeito das plantas transgênicas tolerantes ao glifosato.

Palavras-chave: herbicida; defesas induzidas, COV, OGMs; rota do ácido chiquímico.

SOYBEAN (*Glycine max*) PLANTS GENETICALLY MODIFIED TO EXPRESS RESISTANCE TO GLYPHOSATE: CAN THEY MODIFY AIRBORNE SIGNALS IN TRITROPHIC INTERACTIONS?

Abstract: Upon herbivory, plants activate complex biochemical pathways that result in an array of defense responses including the emission of a novel blend of volatile organic compounds (VOCs). These compounds mediate the recruitment of predators and parasitoids that exert biological control of the attacking herbivore. Genetic manipulation of a particular trait to improve agricultural plant varieties may affect other traits as a result of possible pleiotropy or insertional mutations, which in turn can affect the interaction of the plant with other organisms. Changes in herbivore-induced VOC emissions are known to occur in transgenic plants engineered to express resistance to insects (mainly Bt-plants), not only as a result of modified insect behavior but also as a result of altered resource allocation. Transgenic glyphosate-tolerant plants express a variant of the enzyme EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) that is insensitive to the herbicide glyphosate. This enzyme is essential in metabolic routes that result in the synthesis of amino acids and secondary metabolites. We addressed whether the constitutive and *Anticarsia gemmatilis*-induced emissions of VOCs from a transgenic soybean line differ from those of the isoline, and whether changes may interfere in the foraging behavior of the predatory bug *Podisus nigrispinus*. GC-MS analyses showed that both herbivory and genotype influences VOC emissions. The effect of genotype for several individual compounds appears to owe mainly to the effect on the herbivore-induced emissions. Larger emissions were measured in the transgenic line than the non-transgenic line upon herbivory. *P. nigrispinus* significantly discriminated between the odors of undamaged and damaged plants of the non-transgenic line. No preference was observed for herbivore-damaged plants of any of the two lines over the other. The results from this study show that despite a greater emission of volatiles that the predators are not able to discriminate between herbivore-damaged and undamaged transgenic plants. This study opens possibilities for new studies of chemical ecology in tritrophic systems to assess the effect of transgenic glyphosate resistant plants.

Keywords: herbicide; induced defenses; VOC, GMOs, shikimic acid pathway.

1. INTRODUÇÃO

Desde a introdução dos transgênicos no início de 1990, a adoção de linhagens produzidas por engenharia genética tem aumentado em vários países (FAO 2011). No entanto, as preocupações com o possível impacto adverso sobre a saúde humana e ao meio ambiente ainda são alvo de grande discussão. Efeitos não-alvo incluem o desenvolvimento de "super ervas daninhas" ou resistência de insetos (Ferry e Gatehouse 2009). A manipulação genética de uma característica particular pode afetar outras como um resultado de uma possível pleiotropia ou mutações de inserção (Schuler et al. 1999). Durante os últimos anos, vários estudos têm-se centrado sobre o impacto do gene *Bt* sobre as emissões de COVs de planta e os possíveis efeitos sobre herbívoros e carnívoros (Yan et al. 2004, Turlings et al. 2005, Dean e De Moraes 2006, Himanen et al. 2009). Mais recentemente, alguns estudos também avaliaram os efeitos das plantas modificadas para expressar resistência a *Venturia inaequalis* (Pleosporales: Venturiaceae), o agente causal da doença sarna da macieira, na indução de emissão de voláteis e a resposta de um parasitoide aos COVs induzidos por herbívoros (Vogler et al. 2009, Vogler et al. 2010). No entanto, nenhum estudo avaliou a ecologia de interações mediadas por COVs entre plantas geneticamente modificadas para expressar tolerância ao glifosato [(N- (fosfonometil) Gli] e os níveis tróficos superiores.

Plantas tolerantes ao glifosato expressam uma variante da enzima bacteriana EPSPS (5-enol-piruvilchiquimato-sintase-3-fosfato) que é insensível ao glifosato, desta forma, a nova enzima confere tolerância ao herbicida. Na planta, a EPSPS catalisa a formação da 5-enol-piruvilchiquimato-sintase-3-fosfato a partir da chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato, na via do chiquimato, que é a via biossintética dos aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, tirosina, triptofano e que, por sua vez são precursores de compostos envolvidos no crescimento, reprodução e respostas das plantas ao estresse (Maeda e Dudareva 2012). O triptofano é o precursor do indole que se sabe ser induzido mediante herbivoria em algumas espécies de plantas, incluindo o milho e soja (Turlings et al. 2005, Rostás e Eggert 2008). L-fenilalanina é o precursor de fenilpropanoides voláteis, tais como o salicilato de metila (MeSA), que é emitido por plantas de soja (Rostás e Eggert 2008). Plantas de soja geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato podem, obviamente, desenvolver-se normalmente. No entanto, mudanças em seu metabolismo podem ocorrer. Um estudo metabolômico comparativo mostrou pequenas variações qualitativas em alguns metabólitos de sementes entre uma cultivar transgênica e uma isogênica (García-Villalba et al. 2008). Em outro estudo, foram

identificadas diferenças na expressão de proteínas entre sementes de soja transgênicas e não transgênicas (Brandão et al. 2010). Mais recentemente, demonstrou-se que o acúmulo de lignina nas raízes é mais elevado em plantas de soja transgênicas tolerantes ao glifosato (Zonetti et al. 2012). De acordo com Arruda et al. (2013) os respectivos resultados dos últimos oito anos concluem que a própria modificação genética contribui para alterações de características de plantas de soja, produzindo alterações, em forma de cascata, no metabolismo. Portanto, é possível que essas alterações tenham implicações nas interações planta-inseto.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar se a inserção do gene de tolerância ao glifosato em soja influencia a emissão de COVs induzidos por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebididae) e o comportamento do predador *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae).

2.2 Específicos

- Identificar diferenças no perfil de voláteis constitutivos emitidos por plantas de soja das linhagens CD 202 (isogênica) e CD 202 RR (transgênica);
- Identificar diferenças no perfil de voláteis induzidos pela herbivoria de *A. gemmatalis* emitidos por plantas de soja das linhagens CD 202 e CD 202 RR;
- Avaliar o ganho de peso de *A. gemmatalis* alimentadas com soja transgênica ou isogênica;
- Avaliar a preferência de oviposição de *A. gemmatalis* em soja transgênica ou isogênica;
- Avaliar a resposta comportamental de ninfas de *P. nigrispinus* frente aos odores emitidos por soja controle e danificada pela herbivoria de *A. gemmatalis* das linhagens CD 202 e CD 202 RR

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Plantas de soja: Sementes de soja (*Glycine max*) das linhagens CD202 e CD202 RR foram cedidas pela COODETEC (Cascavel, Paraná, Brasil). As sementes foram colocadas em câmaras de germinação a 25°C no escuro. Três dias após a germinação, estas foram semeadas individualmente em bandejas de plástico (parte superior: 6x6 cm; profundidade: 4,5 x 4,5 cm; altura: 5,5 cm) contendo substrato comercial (Vida Verde,

São Paulo, Brasil). As plantas se desenvolveram em iluminação artificial, no regime de luz 14:10 (L:E) até atingir o estágio V3 (de acordo com Fehr et al. 1971), aproximadamente cinco semanas após a semeadura, que é período em que as plantas começam a ser atacadas em campo. As plantas foram regadas quando necessário.

3.2 Criação de *A. gemmatalis*: As lagartas foram criadas em condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C) e fotoperíodo (14:10 L:E). Os adultos foram mantidos em tubos de PVC forrados com papel para oviposição e alimentados diariamente com uma solução a base de mel (mel, ácido sórbico, metil parabeno, açúcar e água destilada) misturada com cerveja (3:1 v/v), conforme utilizado em criação massal de *A. gemmatalis* (Hoffman-Campo 1985). Os ovos, coletados a cada 2 ou 3 dias, foram colocados em caixas de plástico contendo dieta a base de feijão para alimentação das larvas (Parra 2001). Ao atingirem o estágio de pré-pupa foram transferidas para caixas de plástico contendo vermiculita até a pupação.

3.3 Criação de *P. nigrispinus*: Ovos de *P. nigrispinus* foram obtidos de uma criação da Universidade Federal de Sergipe (Sergipe, Brasil). Ninfas de 2º instar foram alimentadas com larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) de 3º e 4º instares provenientes de criação em laboratório até a utilização nos experimentos. Os insetos foram criados em condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C) e fotoperíodo (14:10 L:E).

3.4 Ganho de peso de *A. gemmatalis* alimentadas com soja transgênica ou isogênica: Lagartas de *A. gemmatalis* de 24 h de idade foram pesadas em balança analítica e individualizadas em copos de plástico com tampa. Durante sete dias foram oferecidas folhas da cultivar CD 202 (N= 27) ou CD 202 RR (N= 27) para alimentação (o quanto necessário). Após este período as lagartas foram novamente pesadas e seu peso ou o número de lagartas mortas foi anotado em planilha.

3.5 Preferência de oviposição por *A. gemmatalis* em soja transgênica ou isogênica: Duas fêmeas acasaladas de 3-4 dias de idade foram colocadas em uma gaiola de acrílico com uma planta de soja transgênica e uma planta de soja isogênica. Após duas escotofases as plantas foram retiradas da gaiola e contou-se o número de ovos colocados em cada planta. Cada gaiola constituiu uma repetição (N=20).

3.6 Coleta e análise de voláteis: Os COVs foram coletados de plantas controle e plantas danificadas por herbivoria, de ambas as linhagens, CD202 e CD202RR. A indução de voláteis foi realizada pela infestação de cada planta com 10 larvas de 3º instar por 24 horas, condição estabelecida por testes prévios. As larvas foram removidas antes do início das coletas. As plantas foram retiradas das bandejas de plástico e o substrato foi envolvido por papel alumínio para reduzir a emissão de voláteis da raiz e do solo. Quatro plantas, uma de cada tratamento, foram colocadas individualmente dentro de câmaras de vidro de 1 L conectadas por uma entrada de ar. Um fluxo de ar umidificado e filtrado de 4L/min foi canalizado através de um tubo de vidro e dividido em quatro, resultando em um fluxo de ar de 1 L/ min para cada câmara. Os COVs foram coletados em uma coluna de vidro contendo 20 mg de polímero adsorvente (HayeSep® Q 80-100) por um período de 24 horas. Depois da coleta, a parte acima do solo das plantas foi cortada e secada em estufa por 48 horas a 60°C para quantificar o peso seco (PS). Os voláteis coletados foram eluídos com 300 µL de hexano (tipo HPLC bidestilado) e 10 µL de tetradecano (50 ppm) foi adicionado como padrão interno (PI). As amostras foram concentradas até 100 µL e 1µL do extrato final foi injetado automaticamente no modo *splitless* (temperatura do injetor de 250°C) e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, Shimadzu QP 2010 Plus) equipado com uma coluna RTX-5 (30 m×0,25 mm i.d., 0,25 mm film thickness; Restek, Bellefonte, PA, USA). O gás Hélio foi utilizado como carreador na coluna com pressão de 170 kPa. A quantificação individual dos compostos foi realizada com base na área do pico do padrão interno. As emissões foram expressas em ng g PS⁻¹ 24 h⁻¹. Os compostos foram identificados por comparação de espectro de massas com a biblioteca NIST 27 e NIST 147 e por comparação com o Índice de Kovats (IK) calculado com o reportado na literatura. Em adição, os tempos de retenção e espectros de massa dos compostos (Z)-3-hexen-1-ol, (Z)-3-acetato de hexenila, octanal, 1-octen-3-ol, (Z)-β-ocimeno, β-linalool, decanal, MeSA, indol, (Z)-jasmona, β-cariofileno e α-farneseno foram comparados aos de compostos sintéticos comerciais. Um total de 6 a 8 repetições de todos os tratamentos foram coletadas e analisadas.

3.7 Preferência de odor por *P. nigrispinus*: A resposta de *P. nigrispinus* foi avaliada em um bioensaio de dupla escolha utilizando um olfatômetro em Y (Ø = 2 cm; braço principal = 18 cm; braços menores = 13 cm). Um fluxo de ar de 1,2 L/min umidificado

e filtrado foi igualmente dividido em duas partes e introduzidos em câmaras de 1-L, contendo as fontes de odor. Assim, cada braço do olfatômetro recebeu um fluxo de ar de 0,6 L / min. Cada fonte de odor consistiu em uma planta de soja na fase V3 (transgênica ou isogênica) controle ou danificada por *A. gemmatalis*, tal como descrito acima. Ninfas de 3º instar (escolhidas pelo maior potencial de predação), após jejum de 24 horas, foram colocadas individualmente no início do braço principal e escolheram entre as fontes de odor. Considerou-se que um inseto respondeu quando passou o ponto médio de um dos braços e lá permaneceu por pelo menos 5 segundos. Quando não houve escolha por um dos braços, durante um período de 10 minutos, foi considerado como não resposta, e estes insetos foram excluídos da análise dos dados. O olfatômetro foi girado 180 ° depois de cada observação. Depois de cinco observações, as fontes de odor foram rotacionadas e depois de 10 observações as plantas foram substituídas por novas. Os experimentos foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 horas a 25°C. Os experimentos foram: a) plantas controle vs. plantas induzidas por herbivoria (isogênica); b) plantas controle vs. plantas induzidas por herbivoria (transgênica); 3) plantas induzidas por herbivoria isogênica vs. plantas induzidas por herbivoria transgênica. Pelo menos cinco plantas de cada tratamento foram utilizadas nos bioensaios.

3.8 Análises estatísticas: A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa SPSS 21.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados de alimentação foram analisados com teste T para comparação de médias de duas amostras independentes. Para oviposição foi realizado um teste não paramétrico para amostras pareadas (Wilcoxon Signed Ranks Test). Os dados de emissão de COVs foram transformados em log (Log X + 2) e analisados com MANOVA com o genótipo e herbivoria na interação entre fatores principais. A preferência dos predadores no olfatômetro foi analisada pela aplicação do teste χ^2 não paramétrico.

4. RESULTADOS

4.1 Ganho de peso de *A. gemmatalis* alimentadas com soja transgênica ou isogênica: Lagartas alimentadas com soja transgênica tiveram aumento de peso significativamente maior (Média \pm EPM 107,45 mg \pm 6,97) do que aquelas alimentadas com soja isogênica (Média \pm EPM 75,09 mg \pm 7,32) no período de tempo avaliado ($P < 0,02$).

4.2 Preferência de oviposição por *A. gemmatalis* em soja transgênica ou isogênica:

Houve preferência de oviposição de fêmeas em soja transgênica em comparação com a isogênica ($P = 0,05$).

4.3 Emissão de voláteis por plantas de soja: Emissões de voláteis por plantas de soja das variedades CD202 RR e CD202 danificadas ou não por herbivoria estão apresentadas na Tabela 1. O genótipo (MANOVA, Pillai's Trace, $P = 0.003$), herbivoria (MANOVA, Pillai's Trace, $P = 0.001$) e a combinação de ambos (MANOVA, Pillai's Trace, $P = 0.002$) afetou a emissão de COVs. Independentemente do genótipo, a herbivoria por *A. gemmatalis* aumentou significativamente ou induziu a emissão de vários compostos alifáticos, todos os terpenoides, todos os compostos aromáticos e dois dos três compostos não identificados detectados. Apenas as emissões de nonanal e decanal não foram afetadas pela herbivoria (valores de P estão apresentados na Tabela 2). O genótipo da planta teve um efeito significativo sobre as emissões de (Z) -3-hexen-1-ol ($P = 0,001$); 1-octen-3-ol ($P = 0,022$); (Z) -3-acetato de hexenila ($P = 0,006$), (Z) - β -ocimeno ($P < 0,001$), β -linalol ($P = 0,002$); nonanal ($P = 0,009$); composto não identificado 1 ($P < 0,001$); composto não identificado 2 ($P = 0,008$); MeSa ($P = 0,005$); (Z) -hexenyl-2-metilbutirato ($P = 0,003$); indole ($P = 0,015$) (Z) jasmona ($P = 0,001$); β -cariofileno ($P = 0,004$), α -cariofileno ($P = 0,004$), α -farneseno ($P = 0,017$) e TMTT ($P < 0,001$). Com a exceção de 3-octanone, 3-octanol e o composto não identificado 3, houve uma significativa interação entre o genótipo e a herbivoria para todos os compostos. Isto sugere que as emissões induzidas por herbívoros variam nas plantas transgênicas e isogênica. Após herbivoria, ocorreu um aumento na emissão de todos COVs detectados, sendo a quantidade maior nas plantas transgênicas do que nas plantas isogênica (Figura 1, Tabela 2, para os valores de P).

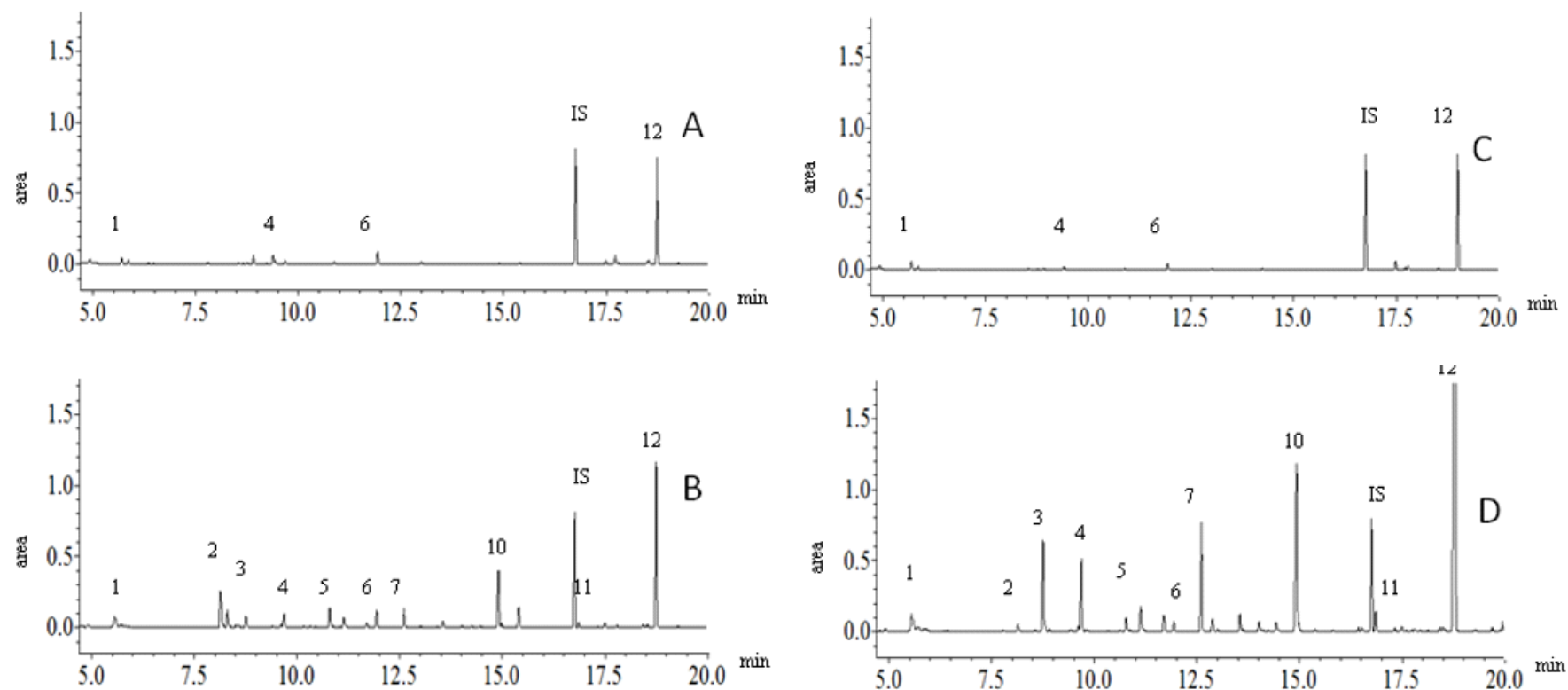


Figura 1. Cromatograma típico de cultivar isogênica (A) e transgênica controle (C), isogênica danificada (B) e soja transgênica tolerante ao glifosato (D) sujeita a alimentação de *Anticarsia gemmatalis*. Os principais compostos induzidos por herbivoria são: 1) (Z) 3-hexen-1-ol; 2) 1-octen-3-ol; 3) 4-hexen-1-ol; 4) (Z)- β -ocimeno; 5) β -linalool; 6) composto não-identificado 1; 7) composto não-identificado 2; 8) MeSA; 9) (Z)-3-hexenil-2- metilbutirato; 10) indol; 11) (Z)- jasmona; 12) α -farneseno.

Tabela 1: Emissões de compostos orgânicos voláteis individuais (ng/g ps⁻¹ 24h⁻¹) por plantas de soja transgênicas e isogênicas não danificadas e danificadas por *Anticarsia gemmatalis* (média ± E.P.M)

Composto	T.R	I. K. (c)	Plantas controle		Plantas danificadas por <i>A.gemmatalis</i>	
			Isogênica (IC)	Transgênica (TC)	Isogênica (IH)	Transgênica (TH)
			N = 8	N = 6	N = 8	N = 8
Alifáticos						
(Z)-3-hexen-1-ol	5.550	851	nd	Nd	2,61 ± 0,99	8,42 ± 1,56
1-octen-3-ol	8.124	978	nd	Nd	7,22 ± 3,86	28,42 ± 7,74
3-octanona	8.293	985	nd	Nd	2,69 ± 1,79	3,34 ± 0,90
3-octanol	8.494	996	nd	Nd	0,21 ± 0,10	0,38 ± 0,18
Octanal	8.656	1003	0,11 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,31 ± 0,10
(Z)-3-acetato de hexenila	8.743	1007	0,32 ± 0,19	0,08 ± 0,03	1,38 ± 0,64	14,37 ± 4,34
Nonanal	10.865	1106	0,47 ± 0,08	0,35 ± 0,10	0,28 ± 0,04	0,85 ± 0,09
Decanal	12.997	1206	0,61 ± 0,11	0,50 ± 0,22	0,39 ± 0,08	1,34 ± 0,41
(Z)-3-hexenil-2-metilbutirato	13.542	1234	nd	Nd	1,25 ± 0,52	9,15 ± 3,23

(Z)-jasmona	16.846	1406	0,10	$\pm 0,07$	0,04	$\pm 0,03$	0,58	$\pm 0,24$	5,24	$\pm 1,67$
-------------	--------	------	------	------------	------	------------	------	------------	------	------------

Composto	T.R	I. K. (c)	Plantas controle		Plantas danificadas por <i>A.gemmatalis</i>	
			Isogênica (IC)	Transgênica (TC)	Isogênica (IH)	Transgênica (TH)
			N = 8	N = 6	N = 8	N = 8
Terpenoides						
(Z)-β-ocimeno	9.669	1051	0,43 ± 0,13	0,11 ± 0,08	1,83 ± 0,79	16,22 ± 3,25
β-linalol	10.785	1100	nd	Nd	2,17 ± 1,07	18,90 ± 6,39
β-cariofileno	17.306	1433	0,13 ± 0,05	0,03 ± 0,02	0,10 ± 0,05	0,89 ± 0,20
α-cariofileno	17.921	1454	0,04 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,31 ± 0,07
α-farneseno	18.731	1515	8,55 ± 2,99	5,44 ± 3,53	22,21 ± 9,32	157,53 ± 33,13
TMTT	19.928	1584	nd	Nd	0,08 ± 0,03	1,14 ± 0,27
Aromáticos						
MeSA	12.868	1201	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,07	0,15 ± 0,05	1,11 ± 0,32
Indol	14.891	1304	0,81 ± 0,52	0,10 ± 0,05	10,83 ± 3,05	49,55 ± 11,58
Não-identificados						
Comp. 1	11.685	1144	nd	Nd	0,70 ± 0,28	5,55 ± 1,32
Comp. 2	12.596	1235	nd	Nd	2,73 ± 1,19	21,75 ± 7,42
Comp. 3	16.344	1380	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,20 ± 0,08

E.P.M. = Erro padrão da média

T.R = Tempo de retenção

I.K. (c) = Índice de Kovats calculado

Tabela 2: Valores de *P* e principais efeitos do genótipo e herbivoria por *Anticarsia gemmatalis* e suas interações nas emissões de compostos orgânicos voláteis individuais

Compostos	Genótipo	Herbivoria	Interação
Alifáticos			
(Z)-3-hexen-1-ol	0,001	< 0,001	0,001
1-octen-3-ol	0,022	< 0,001	0,022
3-octanona	0,317	0,001	0,317
3-octanol	0,468	0,010	0,468
Octanal	0,122	0,062	0,034
(Z)-3-acetato de hexenila	0,006	< 0,001	0,002
Nonanal	0,009	0,067	< 0,001
Decanal	0,084	0,185	0,015
(Z)-3-hexenil-2- metilbutirato	0,003	< 0,001	0,003
(Z)-jasmona	0,001	< 0,001	0,001
Terpenoides			
(Z)- β -ocimeno	< 0,001	< 0,001	< 0,001
β -linalol	0,002	< 0,001	0,002
β -cariofileno	0,004	< 0,001	< 0,001
α -cariofileno	0,004	< 0,001	< 0,001
α -farneseno	0,017	< 0,001	0,001
TMTT	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Aromáticos			
MeSA	0,005	0,005	0,009
Indol	0,015	< 0,001	0,001
Não identificados			
Comp. 1	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Comp. 2	0,008	< 0,001	0,008
Comp. 3	0,439	0,117	0,085

4.4 Preferência de odores por *P. nigrispinus*: Ninfas de *P. nigrispinus* foram capazes de discriminar plantas isogênicas danificadas ou não por herbivoria ($P = 0,028$), entretanto não foram capazes de discriminar plantas transgênicas danificadas ou não por herbivoria ($P = 0,083$). As ninfas não discriminaram plantas danificadas por herbivoria da variedade transgênica e isogênica ($P = 0,194$) (Figura 2).

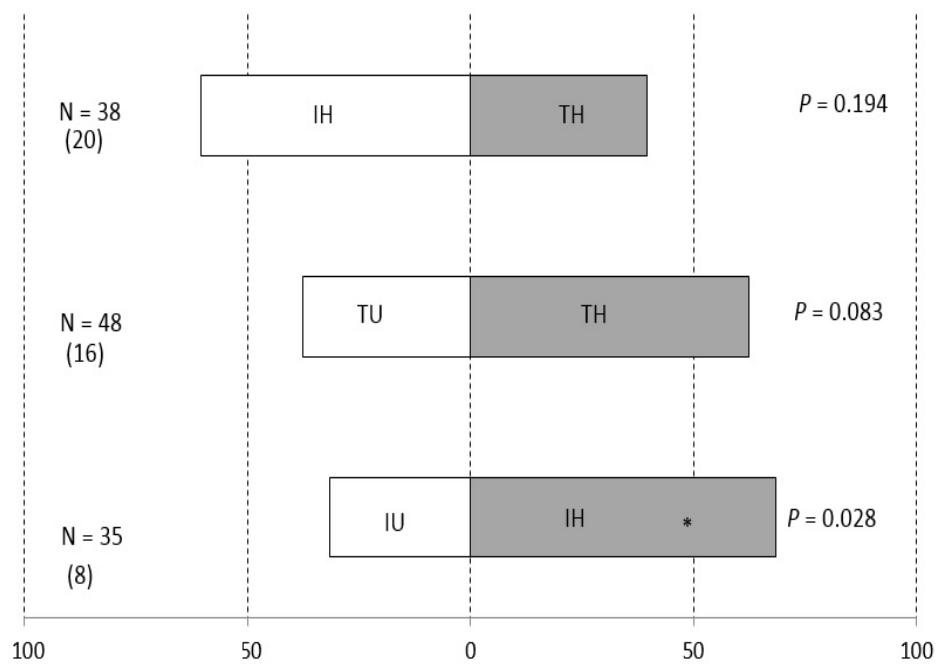


Figura 2. Orientação de ninfas de *Podisus nigrispinus* para os odores de plantas não danificadas (C) danificadas por *Anticarsia gemmatilis* (H) transgênicas (T) e cultivar isogênica (I), e aos odores de plantas danificadas por herbivoria de ambas linhagens. O asterísco mostra o nível de significância $P < 0,05$ *, n.s. média “não significativa”. Números à esquerda mostram o total de insetos que respondeu para cada tratamento (N). O número de insetos que não respondeu é mostrado entre parênteses.

5. DISCUSSÃO

A principal conclusão deste trabalho é de que as plantas transgênicas e isogênicas emitem diferentes misturas de COVs nas mesmas condições de herbivoria. Emissões de COVs constitutivos não foram drasticamente afetadas pela modificação genética. Em contraste, a herbivoria por *A. gemmatilis* aumentou substancialmente a emissão de COVs emitidos por plantas transgênicas tolerantes ao glifosato em comparação com a sua cultivar isogênica. Estes resultados contrastam com o que tem sido observado em linhagens de milho *Bt*, que emitem menor quantidade de compostos orgânicos voláteis do que as linhas não transgênicas (Dean e De Moraes et al. 2006; Turlings et al. 2005). Há duas explicações possíveis para nossas descobertas. A primeira explicação é de que a indução e emissão de COVs pode ter sido alterada em plantas transgênicas. De acordo com Arruda et al. (2013), as modificações genéticas de plantas tolerantes ao glifosato alteram o metabolismo da planta inteira. De fato, há evidências de que o metabolismo do teor de lignina nas raízes das plantas de soja transgênica é diferente em relação a cultivar isogênica (Zonetti et al. 2012). No milho, plantas *Bt* emitem quantidades menores de COVs do que as linhas não-transgênicas, resultado não só da redução da alimentação do inseto, mas também da alteração de alocação de carbono na planta (Dean e De Moraes et al. 2006; Turlings et al. 2005), portanto, uma segunda explicação é que *A. gemmatilis* modificou seu comportamento alimentar na linhagem transgênica, aumentando a duração do forrageamento, o que foi verificado pelo aumento de peso nas lagartas que foram alimentadas com soja transgênica. Isto pode ser possível considerando que alterações em outros metabólitos secundários derivados de fenilalanina podem ter ocorrido (Zonetti et al. 2012). Flavonoides, por exemplo, são sintetizados a partir de fenilalanina (Dixon e Paiva 1995) e são componentes importantes da resistência da soja. A rutina e genistina são dois dos flavonoides presentes em várias plantas de soja que afetam negativamente o desempenho de *A. gemmatilis*, quando presentes em grandes quantidades (Piubelli et al. 2005). Assim, se o teor de metabólitos secundários é menor na cultivar transgênica, *A. gemmatilis* pode ter se beneficiado e aumentou o seu tempo de alimentação sobre o tecido da folha. Por outro lado, fagoestimulantes tais como açúcares ou aminoácidos (Chapman 2003) podem estar presentes em quantidades mais elevadas na cultivar transgênica. Apesar do perfil de voláteis constitutivos não ter sido alterado em plantas transgênicas, observou-se uma preferência das fêmeas em ovipositar nestas plantas. Possivelmente, compostos não voláteis estão envolvidos nesta escolha. Os potenciais

papéis de outros metabólitos primários e secundários merecem uma investigação mais aprofundada.

Modificações provocadas por engenharia genética podem afetar interações planta-inseto através de alterações na qualidade de recursos da planta, tanto por efeitos pleotrópicos ou mutação de inserção (Schuler et al. 1999). Até o momento, a maioria dos estudos que avaliaram os efeitos da engenharia genética em interações planta-inseto mediadas por COVs têm-se centrado sobre a expressão do gene *Bt*. Isso se deve ao fato de que a resistência ao inseto é o fato mais provável de influenciar o comportamento de alimentação e desempenho do herbívoro, e, por sua vez, afetam direta ou indiretamente artrópodes de níveis tróficos superiores (Schuler et al. 1999). Em contraste, a variante insensível da EPSPS confere tolerância da planta ao herbicida, sem exercer um efeito direto sobre o inseto. A enzima é parte da via do ácido chiquímico envolvido na síntese de compostos aromáticos essenciais em plantas superiores (Maeda e Dudareva 2012). Os produtos desta via metabólica são os aminoácidos triptofano, L-fenilalanina e tirosina que, por sua vez, são precursores de muitos compostos naturais, incluindo numerosos compostos voláteis orgânicos. O triptofano é o precursor do indol, um composto que se sabe ser induzido por herbívoros em algumas espécies de plantas, incluindo o milho e soja (Turlings et al. 2005, Rostás e Eggert 2008). L-fenilalanina é o precursor de fenilpropanóides/benzênicos voláteis, tais como o salicilato de metila (MeSA). O MeSa é emitido por plantas de soja (Rostás e Eggert 2008), atua como um infoquímico para predadores (De Boer e Dicke 2004, Zhu e Park 2005) e é um importante sinal celular para o desenvolvimento de resistência sistêmica adquirida contra patógenos (Park et al. 2007). Já o ácido salicílico, que lhe dá origem, está envolvido na ativação de defesa direta e indireta em patógenos e insetos sugadores (Walling 2000), bem como na indução de compostos voláteis que atraem parasitoides (van Poecke e Dicke 2002). Muitos benzenoides são os principais componentes da mistura de COVs emitidos por flores e atraem polinizadores (Raguso 2004).

Os resultados do bioensaio mostraram que ninfas de *P. nigrispinus* preferiram os odores de plantas danificadas por herbivoria aos odores de plantas não danificadas da cultivar isogênica. No entanto, elas não são capazes de discriminar entre as plantas transgênicas danificadas por herbivoria e não danificadas. Uma vez que as plantas transgênicas emitiram maiores quantidades de substâncias voláteis, que podem ajudar os insetos a discriminar mais rápido entre as plantas, poderia se esperar que estas plantas fossem mais atrativas. No entanto, inimigos naturais nem sempre se orientam em

direção a plantas que emitem grandes quantidades de produtos voláteis (Fritzsche-Hoballah et al. 2002). Na planta de milho *Bt* a diminuição na emissão de COVs por plantas transgênicas não afetou o comportamento de forrageamento de inimigos naturais (Turlings et al. 2005). Com base nas medições de COVs induzidos por herbívoros, foi evidente que as emissões de compostos terpenoides induzidos (particularmente, (Z) -3-hexen-1-ol, (Z)-3-hexenil-2-metilbutirato e (Z)-jasmona) foram maiores nas plantas transgênicas do que nas plantas não transgênicas. A razão entre alguns compostos ativos (Bruce et al. 2005, Bruce et al. 2010) pode ser importante na indução de resposta de insetos e as razões alteradas na mistura emitida pelas plantas transgênicas podem ter alterado a percepção de *P. nigrispinus*. Um estudo para avaliar a resposta das antenas para compostos individuais confirmou que *P. nigrispinus* explora voláteis de planta para localizar suas presas, mas a resposta para misturas específicas não foi estudada (Sant'ana e Dickens 1998). Por outro lado, *P. nigrispinus*, é um inseto generalista que se alimenta de uma vasta gama de presas em várias culturas (Torres et al. 2006). Predadores generalistas são conhecidos por responder de forma diferente a compostos voláteis em função de experiências anteriores com a presa (Drukker et al. 2000). Recentemente demonstrou-se que as respostas dos predadores generalistas para diferentes genótipos de plantas podem ser moduladas após a aprendizagem associativa (Glinwood et al. 2011). Como insetos generalistas, o seu tempo de busca e as respostas podem se beneficiar da aprendizagem associativa. Assim, esses resultados podem refletir a falta de experiência de *P. nigrispinus*. Estudos futuros utilizando carnívoros mais especializados ou outros herbívoros como insetos modelo podem ser úteis para compreender melhor se nossas conclusões sobre COVs induzidos por herbívoros pode afetar o forrageamento de inimigos naturais ou pode apoiar os nossos resultados.

6. REFERÊNCIAS

Bernasconi ML, Turlings TCJ, Ambrosetti L, Bassetti P, Dorn S (1998) Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. Entomol Exp Appl 87: 133-142.

Bruce TJA, Midega CAO, Birkett MA, Pickett JA & Khan ZR (2010) Is quality more important than quantity? Insect behavioural responses to changes in a volatile blend after stemborer oviposition on an African grass. Biol Lett 6: 314-317.

Bruce TJA, Wadham LJ, Woodcock CM (2005) Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci* 10: 269-274.

Campo CBH, Oliveira EB, Moscardi F (1985) Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Embrapa CNPSo. 23p.

Chapman RF (2003) Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annu Rev Entomol* 48:455–84.

De Boer JG, Dicke M (2004) The role of methyl salicylate in prey searching behavior of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. *J Chem Ecol* 30: 255-271.

Dean JM, De Moraes CM (2006) Effects of genetic modification on herbivore-induced volatiles from maize. *J Chem Ecol* 32: 713-724.

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7: 1085–1097.

Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 25: 417-440.

Drukker B, Bruin J, Sabelis MW (2000) Anthocorid predators learn to associate herbivore-induced plant volatiles with presence or absence of prey. *Physiol. Entomol.* 25: 260-265.

Fehr, W, Caviness C, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci* 11: 929-931.

Ferry N, Gatehouse AMR (2009) Environmental impact of genetically modified crops, Cambridge, CABI International.

Food and Agriculture Organization (2011) Genetically modified crops. <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e04d.pdf> (Last Access September 4, 2014).

Fritzsche-Hoballah ME, Tamò C, Turlings TC (2002) Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? *J Chem Ecol* 28:951-68.

Glinwood R, Ahmed E, Qvarfordt E, Ninkovic V (2011) Olfactory learning of plant genotypes by a polyphagous insect predator. *Oecologia* 166: 637–647

Gouinguéné SP, Städler E (2006) Oviposition in *Delia platura* (Diptera, Anthomyiidae): the role of volatile and contact cues of bean. *J Chem Ecol* 32: 1399-1413.

Himanen SJ, Nerg AM, Nissinen A, Pinto DM, Stewart CN Jr, Poppy GM, Holopainen JK (2009) Effects of elevated carbon dioxide and ozone on volatile terpenoid emissions and multitrophic communication of transgenic insecticidal oilseed rape (*Brassica napus*). *New Phytol* 181: 174-186.

Landolt PJ, Tumlinson JH, Alborn DH (1999) Attraction of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to damaged and chemically induced potato plants. *Environ Entomol* 28: 973-978.

Maeda H, Dudareva N (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Ann Rev Plant Biol* 63: 73-105.

Meiners T, Hilker M (2000) Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. *J Chem Ecol* 26: 221-232.

ParkS-W; Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113-116.

Parra JRP (2001) Técnicas de Criação de Insetos para Programas de Controle Biológico. FEALQ, Piracicaba.

Pichersky E, Gershenzon J (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Op Plant Biol* 5: 237-243.

Pinto-Zevallos DM, Hellén H, Hakola H, van Nouhuys S, Holopainen JK (2013) Induced defenses of *Veronica spicata*: variability in herbivore-induced volatile organic compounds. *Phytochem Lett* 6: 653-656.

Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Miyakubo SH, de Oliveira MC (2005) Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? *J Chem Ecol* 31:1509-25.

Proffit M, Birgersson G, Bengtsson M, Reis R, Jr., Witzgall P, Lima E (2011). Attraction and oviposition of *Tuta absoluta* females in response to tomato leaf volatiles. *J Chem Ecol* 37: 565-574.

Raguso RA (2004) Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrance-driven pollination. In: Cardé RT, Millar JG (eds) *Advances in Insect Chemical Ecology*. University Press, Cambridge, pp 151-178.

Rostás M, Eggert K (2008) Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis. *Chemoecology* 18: 29 – 38.

Sant’ana J, Dickens JC (1998) Comparative electrophysiological studies of olfaction in predaceous bugs, *Podisus maculiventris* and *P. nigrispinus*. *J Chem Ecol* 24: 965-984.

Schoonhoven LM, van Loon JJ, Dicke M (2006) *Insect-Plant Biology*. University Press, Oxford.

Schuler, T. H., R. P. Potting, Denholm I, Poppy GM (1999) Parasitoid behaviour and Bt plants. *Nature* 400: 825-829.

Ton J, D'Alessandro M, Jourdie V, Jakab G, Karlen D, Held M, Mauch-Mani B, Turlings TC (2006) Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J* 49: 16-26.

Torres JB, Zanuncio JC, Moura MA (2006) The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in *Eucalyptus* forests in Brazil. CAB Reviews: Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat 15: 1-17.

Turlings TC, Jeanbourquin PM, Held M, Degen T (2005) Evaluating the induced-odour emission of a Bt maize and its attractiveness to parasitic wasps. Transgenic Res 14: 807-816.

Turlings TCJ, Wäckers FL (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-damaged plants. In: Cardé RT, Millar J (eds) Advances in Insect Chemical Ecology. University Press, Cambridge, pp 21-75.

Van Poecke RMP, Dicke M (2002) Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. J Exp Bot 53: 1793-1799.

Vogler U, Rott AS, Gessler C, Dorn S (2009) Terpene-mediated parasitoid host location behavior on transgenic and classically bred apple genotypes. J Agric Food Chem 57: 6630-6635.

Vogler U, Rott AS, Gessler C, Dorn S (2010) Comparison between volatile emissions from transgenic apples and from two representative classically bred apple cultivars. Transgenic Res 19: 77-89.

Walling LL (2000) The myriad plant responses to herbivores. J Plant Growth Regul 10: 195-216

Yan F, Bengtsson M, Anderson P, Ansebo L, Xu C, Witzgall P (2004) Antennal response of cotton bollworm (*Helioverpa armigera*) to volatiles in transgenic Bt cotton. J Appl Entomol 128: 354-357.

Zhu J, Park KC (2005) Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. J Chem Ecol 31: 1733-1746.

Zobiolo, LHS, Bonini EA, Oliveira-Junior RS, Kremer RJ, Ferrarese-Filho O (2010) Glyphosate affects lignin content and amino acid production in glyphosate-resistant soybean. *Acta Physiol Plant.* 32:831-837.

Zonetti PC, Suzuki LS, Bonini EA, Ferrarese MLC, Ferrarese-Filho O (2012) High Temperatures on root growth and lignifications of transgenic-resistant soybean. *Agrociencia* 46: 557-565

CAPÍTULO 2

MUDANÇA NO PERFIL DE VOLÁTEIS EMITIDOS POR SOJA
TRANSGÊNICA TOLERANTE AO GLIFOSATO APÓS A HERBIVORIA
INFLUENCIA O COMPORTAMENTO DE *Meteorus rubens* (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE)

MUDANÇA NO PERFIL DE VOLÁTEIS EMITIDOS POR SOJA TRANSGÊNICA TOLERANTE AO GLIFOSATO APÓS A HERBIVORIA INFLUENCIA O COMPORTAMENTO DE *Meteorus rubens* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Resumo: Os avanços na biologia molecular têm permitido a manipulação genética de plantas, visando a introdução de genes que expressem características desejáveis. A soja transgênica (RR) expressa uma variante da enzima EPSPS que está envolvida na via do ácido chiquímico, que é a via metabólica da síntese de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. A inserção da enzima variante CP4 EPSPS permite que plantas expressem resistência ao herbicida glifosato. Durante o processo de engenharia genética efeitos indiretos podem ocorrer. No presente estudo, compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos constitutivamente e após a herbivoria de *Chrysodeixis includens* foram quantificados em soja transgênica e sua linhagem isogênica. COVs induzidos por herbivoria são importantes para o recrutamento de inimigos naturais, portanto, possíveis mudanças nos voláteis podem alterar o comportamento de forrageamento do endoparasitoide larval generalista *Meteorus rubens*. Adicionalmente, avaliamos o desempenho de larvas de *C. includens* em ambas as linhagens. Depois da herbivoria, vários COVs foram induzidos em ambas as variedades. Entretanto, grandes quantidades de voláteis foram emitidos por plantas transgênicas. *Meteorus rubens* foi capaz de discriminar entre os odores de plantas danificadas ou não pela herbivoria de *C. includens*, mas preferiram os odores emitidos por plantas transgênicas danificadas pela herbivoria em comparação com a isogênica também danificada. Não foi observada diferença no peso final de lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica ou isogênica. Nossos resultados sugerem que as interações tritróficas mediadas por COVs não são afetadas por plantas RR, no sistema modelo testado.

Palavras-chave: lagarta falsa medideira; herbivoria; parasitoides; via do ácido chiquímico; voláteis induzidos.

MUDANÇA NO PERFIL DE VOLÁTEIS EMITIDOS POR SOJA TRANSGÊNICA TOLERANTE AO GLIFOSATO APÓS A HERBIVORIA INFLUENCIA O COMPORTAMENTO DE *Meteorus rubens* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Abstract: Advances in molecular biology and biotechnology have allowed genetic manipulation of plants aiming at introducing genes that express desirable characteristics. Transgenic soybean (RR) expresses a variant of the enzyme EPSPS involved in the shikimic acid pathway, which is the metabolic route of the synthesis of three aromatic aminoacids: phenylalanine, tyrosine and tryptophane. The insertion of the variant enzyme CP4 EPSPS allows plants to express insensitivity to the herbicide glyphosate. During the process of genetic engineering unintended effects are likely to occur. In the present study we quantified volatile organic compounds (VOCs) emitted by constitutive and induced upon herbivory by *Chrysodeixis includens* in a transgenic line and its isoline. Since herbivory-induced VOCs are known to play an important role in the recruitment of natural enemies, we assessed whether possible changes alter the foraging behavior of the generalist endoparasitic larval parasitoid *Meteorus rubens*. To support our conclusions we additionally assessed the effect of plant quality on the weight gain of *C. includens*. Upon herbivory, several VOCs were induced in both the conventional and the transgenic line. However larger quantities of a few volatiles were found emitted by transgenic plants. *M. rubens* was able to discriminate between the odors of undamaged and *C. includens*-damaged plants in both of the lines, but preferred the odors of the herbivore-damaged plants emitted of the transgenic line over those emitted by the conventional line. No differences were observed in the weight gain of *C. includens*. Our results suggest that VOC-mediated tritrophic interactions are not affected in the presence of RR-plants, at least in the model system selected.

Key words: Soybean Looper; herbivory; parasitoids; shikimic acid pathway; induced volatiles

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de co-evolução, plantas desenvolveram a capacidade de reconhecer sinais de danos celulares para ativar respostas à herbivoria (Hare 2011). Essas respostas incluem estruturas morfológicas especializadas, como tricomas, bem como compostos químicos que influenciam diretamente a colonização, o estabelecimento e o desempenho dos herbívoros (Karban e Baldwin 1997, Chen et al. 2008, Mithofer e Boland 2012). Além disso, as plantas podem se defender indiretamente através do recrutamento de inimigos naturais dos herbívoros que a atacam (Arimura 2009). Além de néctar extrafloral (para revisão ver Turlings e Wäckers 2004), defesas indiretas incluem a emissão de COVs induzidos por herbívoros. COVs induzidos por herbívoros compreendem uma matriz de compostos a partir de diferentes vias biossintéticas, alguns dos quais podem ser sintetizados *de novo* mediante a herbivoria (Dudareva et al. 2006 para uma revisão). Estes compostos têm sido extensivamente estudados durante as duas últimas décadas, desde o nível molecular até o desenvolvimento de novas estratégias de manejo de pragas, ao explorar como este mecanismo ecológico oferece a possibilidade de melhorar o controle biológico (Turlings e Ton 2006, Kaplan 2012).

Os avanços na biologia molecular têm permitido a manipulação genética de plantas, visando a introdução de genes que expressem características desejáveis. O advento da soja transgênica RR, tolerante ao herbicida Roundup Ready® (glifosato), revolucionou o mercado mundial de soja, sendo autorizado seu cultivo no Brasil em 2005. A Soja RR expressa uma variante da EPSPS, permitindo que as plantas sejam insensíveis ao herbicida. Esta enzima está envolvida na via do ácido chiquímico, que é a via metabólica da síntese de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. Além do seu papel na síntese de proteínas de grande importância para o desenvolvimento da planta (Hermann et al. 1999), também desempenham um papel importante na síntese de metabólitos secundários envolvidos na defesa de plantas (Buchanan et al. 2000).

Estudos recentes têm demonstrado que a modificação genética para tolerância ao glifosato tem consequências no metabolismo da planta, alterando a expressão de proteínas em sementes (García-Villalba et al. 2008; Brandão et al. 2010) e alterando o acúmulo de lignina em raízes (Zonetti et al. 2012). De acordo com Arruda et al. (2013) a própria modificação genética contribui com alterações em uma variedade de características nas plantas de soja em forma de cascata. Chen et al. (2008) não

encontraram variação significativa ao estudar a expressão gênica em folhas de soja de linhas convencionais e transgênicas, apesar de relatarem algumas diferenças, possivelmente, como um efeito não intencional da transformação genética. Com base nisso, não só o metabolismo primário mas também o metabolismo secundário pode ser modificado.

O comportamento e o desempenho de herbívoros e, indiretamente, de inimigos naturais, dependem do metabolismo primário e secundário, portanto, qualquer variação nas características físicas e químicas da planta pode afetar as interações planta-inseto. No caso de plantas transgênicas, as variações nas emissões de COVs induzidos por herbívoros também têm sido relatadas em plantas *Bt*, como resultado da alteração na alocação de carbono e também à modificação na alimentação dos insetos (Turlings et al. 2005). Até o momento nenhum estudo abordou se a transformação genética de plantas de soja para expressar tolerância ao glifosato pode alterar a emissão de COVs induzidos por herbívoros. No presente estudo foi avaliado se a transformação genética de plantas de soja resulta em alteração nas emissões de COVs e se essas alterações podem afetar o comportamento dos níveis tróficos superiores. Como sistema modelo foi utilizado uma linhagem transgênica de soja e sua isogênica, o herbívoro *Chrysodeixis includens* Walker, 1857 (Lepidoptera: Noctuidae) e o parasitoide *Meteorus rubens* (Nees, 1811) (Hymenoptera: Braconidae). *Chrysodeixis includens*, considerada uma praga secundária da cultura da soja no Brasil até 2003, teve seu *status* de praga alterado e se tornou uma das principais pragas nessa cultura, causado mais provavelmente pela perda de inimigos naturais, devido ao grande número de pulverizações de produtos químicos e a concentração de recursos em grandes áreas (monocultura) (Bueno et al. 2007). *Meteorus rubens* é um endoparasitoide gregário cosmopolita que pode se desenvolver em várias espécies de noctuídeos. Apesar do baixo número de estudos que abordam aspectos biológicos e comportamentais desta espécie na região Neotropical, este parasitoide é comumente encontrado parasitando *C. includens* em campos de soja, portanto, estudos que visem as interações entre estes organismos se tornam relevantes. Adicionalmente, avaliamos o desempenho de larvas de *C. includens* em ambas as linhagens.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar se a inserção do gene de tolerância ao glifosato em soja influencia na emissão de COVs induzidos pela herbivoria de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e na atratividade do parasitoide de lagartas *Meteorus rubens* (Hymenoptera: Braconidae).

2.2 Objetivos específicos

- Coletar e analisar os voláteis emitidos por soja CD 202 (isogênica) e CD 202 RR (transgênica) constitutivamente e após a herbivoria de *Chrysodeixis includens*;
- Avaliar o ganho de peso de *C. includens* nas linhagens de soja CD 202 e CD 202 RR;
- Avaliar a preferência de *M. rubens* aos odores de soja tolerante ao glifosato e sua cultivar isogênica danificadas ou não pela herbivoria de *C. includens*.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Plantas de soja: Sementes de soja (*Glycine max*) das linhagens CD 202 e CD 202 RR foram cedidas pela COODETEC (Cascavel, Paraná, Brasil). As sementes foram colocadas em caixas de plástico do tipo gerbox contendo papel filtro umedecido com água destilada e permaneceram no escuro a 25°C até a germinação. Depois foram semeadas individualmente em bandejas de plástico (parte superior: 6x6 cm; profundidade: 4,5 x 4,5 cm; altura: 5,5 cm) contendo substrato comercial (Vida Verde, São Paulo, Brasil). As plantas se desenvolveram em iluminação artificial, no regime de luz 14:10 (L:E) até atingir o estágio V3 (Fehr et al. 1971), aproximadamente cinco semanas após a semeadura e foram regadas quando necessário.

3.2 Criação de *C. includens*: Ovos de *C. includens* provenientes da criação massal da empresa BUG foram mantidos em potes de plástico contendo dieta a base de feijão (Parra 2001) para o desenvolvimento das lagartas. As lagartas foram criadas em condições controladas de temperatura (25±1 °C) e fotoperíodo (14:10 L:E) até a pupação em vermiculita. Os adultos foram mantidos em tubos de PVC forrados com papel para oviposição e foram alimentados diariamente com uma solução a base de

mel (mel, ácido sórbico, metil parabeno, açúcar e água destilada) misturada com cerveja (3:1 v/v), conforme utilizado em criação massal de *A. gemmatalis* (Hoffman-Campo 1985). Os ovos foram coletados a cada 2 dias, reiniciando o ciclo de criação.

3.3 Manutenção de *M. rubens* em laboratório: Lagartas de *C. includens* coletadas na fazenda experimental “Gralha Azul” da PUCPR (Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil) foram mantidas em dieta artificial até a eclosão dos parasitoides. A identificação da espécie foi realizada por Dr. Eduardo Shimbori (Universidade Federal de São Carlos) e Dr. Helmuth Aguirre (Universidade de Wyoming, Laramie). Os adultos foram alimentados com solução a base de mel 10% até a sua utilização nos bioensaios.

3.4 Ganho de peso de *C. includens* alimentadas com soja transgênica ou isogênica: Lagartas de *C. includens* de 24 horas de idade foram pesadas em balança analítica e individualizadas em copos plásticos com tampa. Durante sete dias foram oferecidas folhas da cultivar CD 202 (N= 22) ou CD 202 RR (N= 22) para alimentação. Após este período as lagartas foram novamente pesadas e seu peso ou o número de lagartas mortas foi anotado em planilha.

3.5 Coleta e análise de voláteis: COVs foram coletados de plantas controle e plantas danificadas por herbivoria, de ambas as linhagens, CD202 e CD202 RR. A indução de voláteis foi realizada pela infestação de cada planta com 10 larvas de 3º instar por 24 horas. As larvas foram removidas antes do início das coletas. As plantas foram retiradas das bandejas plásticas e o substrato foi envolvido por papel alumínio para reduzir a emissão de voláteis de outras partes da planta e do solo. Quatro plantas, uma de cada tratamento, foram simultaneamente colocadas dentro de câmaras de vidro de 1 L conectadas em uma entrada de ar. Um fluxo de ar umidificado e filtrado de 4L/min foi canalizado através de um tubo de vidro e dividido por quatro, resultando em um fluxo de ar de 1 L/min para cada câmara. Os COVs foram coletados em uma coluna de vidro contendo 20 mg de polímero adsorvente HayeSep® Q 80-100 por um período de 24 horas. Depois da coleta, a parte acima do solo das plantas foi cortada e secada em estufa por 48 horas a 60°C para quantificar o peso seco (PS), medida

utilizada posteriormente na quantificação dos voláteis. Os voláteis coletados foram eluídos com 300 µL de hexano tipo HPLC bidestilado, e 10 µL de tetradecano (50 ppm) foi adicionado como padrão interno (PI). As amostras foram concentradas até 100 µL e 1 µL do extrato final foi injetado automaticamente no modo *splitless* (temperatura do injetor de 250°C) e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, Shimadzu QP 2010 Plus) equipado com uma coluna RTX-5 (30 m×0,25 mm i.d., 0,25 mm film thickness; Restek, Bellefonte, PA, USA). O gás Helio foi utilizado como carreador na coluna com pressão de 170 kPa. A quantificação individual dos compostos foi realizada com base na área do pico do padrão interno. As emissões foram expressas em ng g PS⁻¹ 24 h⁻¹. Os compostos foram identificados por comparação de espectro de massas com a biblioteca NIST 27 e NIST 147 e por comparação com o Índice de Kovats (IK) calculado com o reportado na literatura. Em adição, os tempos de retenção e espectros de massa dos compostos (Z)-3-hexen-1-ol, (Z)-3-acetato de hexenila, octanal, 1-octen-3-ol, (Z)-β-ocimeno, β-linalol, decanal, salicilato de metila, indol, (Z)-jasmona, β-cariofileno e α-farneseno foram comparados aos de compostos sintéticos comerciais. Um total de 10 repetições de todos os tratamentos foram coletadas e analisadas.

3.6 Preferência de odores por *M. rubens*: a resposta foi avaliada com um bioensaio de dupla escolha utilizando um olfatômetro em Y (Ø = 2 cm; braço principal = 18 cm; braços menores = 13 cm). Um fluxo de ar de 1,2 L/min umidificado e filtrado foi igualmente dividido em duas partes, contendo as fontes de odor. Assim, cada braço do olfatômetro recebeu um fluxo de ar de 0,5 L / min. Cada fonte de odor consistiu de um pedaço de papel filtro (1 cm x 1cm) contendo 20 µl de extrato de planta de soja em estágio V3 controle ou induzida por *C. includens*, tal como descrito acima. Fêmeas acasaladas (com idade entre 3-4 dias), foram colocadas individualmente no início do braço principal para que escolhessem entre as fontes de odor. Considerou-se que um inseto tinha respondido quando passou do ponto médio de um dos braços e lá permaneceu por pelo menos cinco segundos. Quando não houve uma escolha por um dos braços durante um período de 10 minutos, foi considerado como não resposta, e estes insetos foram excluídos da análise dos dados. A cada observação, o papel filtro foi trocado e o olfatômetro foi girado 180°. Os experimentos foram conduzidos entre 9:00-17:00 horas a 25 °C. Os tratamentos testados foram: a) extrato de plantas controle vs. extrato plantas induzidas por herbivoria (isogênica); b) extrato de plantas controle

vs. plantas induzidas por herbivoria (transgênica); 3) extrato de plantas induzidas por herbivoria isogênica vs. plantas induzidas por herbivoria transgênica.

3.7 Análise estatística: O desempenho de *C. includens* em soja foi analisado através da realização de um teste t para comparar as médias entre o ganho de peso (peso final - peso inicial) das larvas que se alimentaram de folhas de soja transgênica e isogênica. Os COVs individuais foram transformados em $\log(X + 1)$ e submetidos a uma Análise de Componentes Principais (PCA). As análises de variância (ANOVA) seguido de um teste de contraste de médias foram então realizadas para esses PCs que explicavam a principal variação percentual. A preferência de *M. rubens* aos voláteis de soja foi analisada através da realização de um teste χ^2 . As análises foram realizadas no Ambiente "R" (R Development Core Team, 2006), exceto para a análise de desempenho de larvas que foi realizada em SPSS 21.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

4.RESULTADOS

4.1 Ganho de peso de *C. includens* em soja transgênica e isogênica: não houve diferença significativa no ganho de peso entre lagartas alimentadas com folhas de soja isogênica (Média \pm EPM 8,59 mg \pm 1,20) ou transgênica (Média \pm EPM 11,36 mg \pm 1,80) no período de sete dias ($P > 0,05$).

4.2 Emissão de voláteis: os resultados da emissão de compostos orgânicos voláteis emitidos pelas linhagens de soja CD 202 e CD 202 RR danificadas ou não pela herbivoria de *C. includens* estão apresentados na Tabela 1. A herbivoria induziu os compostos não identificados 1 e 2, (Z)-3-Hexenil-2-metilbutirato e (Z) jasmona nas plantas isogênicas e (Z)-3-Hexen-1-ol, 3-octanone, β - linalol, três compostos não identificados (1-3), (Z)-3-Hexenil-2-metilbutirato, (Z) jasmona, β -cariofileno, α -cariofileno e TMTT nas plantas transgênicas. O PC1 explicou 85,42 % da variação (Figura 2). Houve diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA $F = 4,76$; $P = 0,007$). A emissão de COVs induzidos pela herbivoria de *C. includens* em plantas transgênicas diferiu dos demais tratamentos ($P < 0,05$) principalmente por causa da variação dos compostos α - farneseno, indol, β - ocimeno e (Z)-3-Hexen-1-ol.

Tabela 1: Emissões de compostos orgânicos voláteis individuais (ng/g ps⁻¹ 24h⁻¹) por plantas de soja transgênicas e isogênicas controle e danificadas pela herbivoria de *Chrysodeixis includens* (média ± E.P.M)

Compostos	R.T	K.I.(c)	Plantas controle		Plantas danificadas por <i>C.includens</i>	
			Isogênica (IC)	Transgênica (TC)	Isogênica (CH)	Transgênica (TH)
(Z)-3-Hexen-1-ol	5.581	851	0,04 ± 0,03	nd	1,42 ± 0,53	2,43 ± 0,77
1-octen-3-ol	8.155	978	0,15 ± 0,10	0,01	0,23 ± 0,06	0,55 ± 0,18
3-octanona	8.293	985	nd	nd	0,00	0,04 ± 0,02
octanal	8.668	1003	0,12 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,03
(Z)-3-acetato de hexenila	8.757	1007	0,14 ± 0,09	0,05 ± 0,02	0,51 ± 0,16	0,76 ± 0,20
(Z) β- ocimeno	9.680	1051	0,10 ± 0,04	0,03 ± 0,01	1,51 ± 0,47	3,80 ± 1,24
β- linalol	10.796	1100	0,01	nd	0,24 ± 0,07	0,61 ± 0,14
nonanal	10.877	1106	0,56 ± 0,12	0,38 ± 0,07	0,45 ± 0,06	0,73 ± 0,12
Não identificado 1	11.711	1144	nd	nd	0,37 ± 0,13	0,90 ± 0,39
Não identificado 2	12.608	1235	nd	nd	0,57 ± 0,29	0,88 ± 0,30
MeSa	12.878	1201	0,14 ± 0,05	0,04 ± 0,02	0,26 ± 0,11	0,31 ± 0,06
Decanal	13.007	1206	0,62 ± 0,15	0,45 ± 0,11	0,55 ± 0,09	0,97 ± 0,17
(Z)-3Hexenil-2-metilbutirato	13.549	1234	nd	nd	0,55 ± 0,18	1,11 ± 0,41
indol	14.905	1304	0,12 ± 0,05	0,01	4,26 ± 1,32	8,08 ± 2,01

Composto	T.R	I. K. (c)	Plantas controle		Plantas danificadas por <i>C. includens</i>	
			Isogênica (IC)	Transgênica (TC)	Isogênica (IH)	Transgênica (TH)
			N = 8	N = 6	N = 8	N = 8
Comp. 3	16.344	1380	0,03 ± 0,01	nd	0,09 ± 0,07	0,04 ± 0,01
(Z) jasmona	16.846	1406	nd	nd	0,05 ± 0,02	0,17 ± 0,08
β- cariofileno	17.306	1433	0,06 ± 0,02	nd	0,06 ± 0,02	0,17 ± 0,04
α- cariofileno	17.921	1454	0,01 ± 0,00	nd	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,01
α- farneseno	18.731	1515	4,39 ± 2,07	2,34 ± 1,02	15,44 ± 4,68	30,97 ± 8,50
TMTT	19.928	1584	0,02	nd	0,07 ± 0,02	0,18 ± 0,04

E.P.M. = Erro padrão da média

T.R = Tempo de retenção

I.K. (c) = Índice de Kovats calculado

nd= não detectado

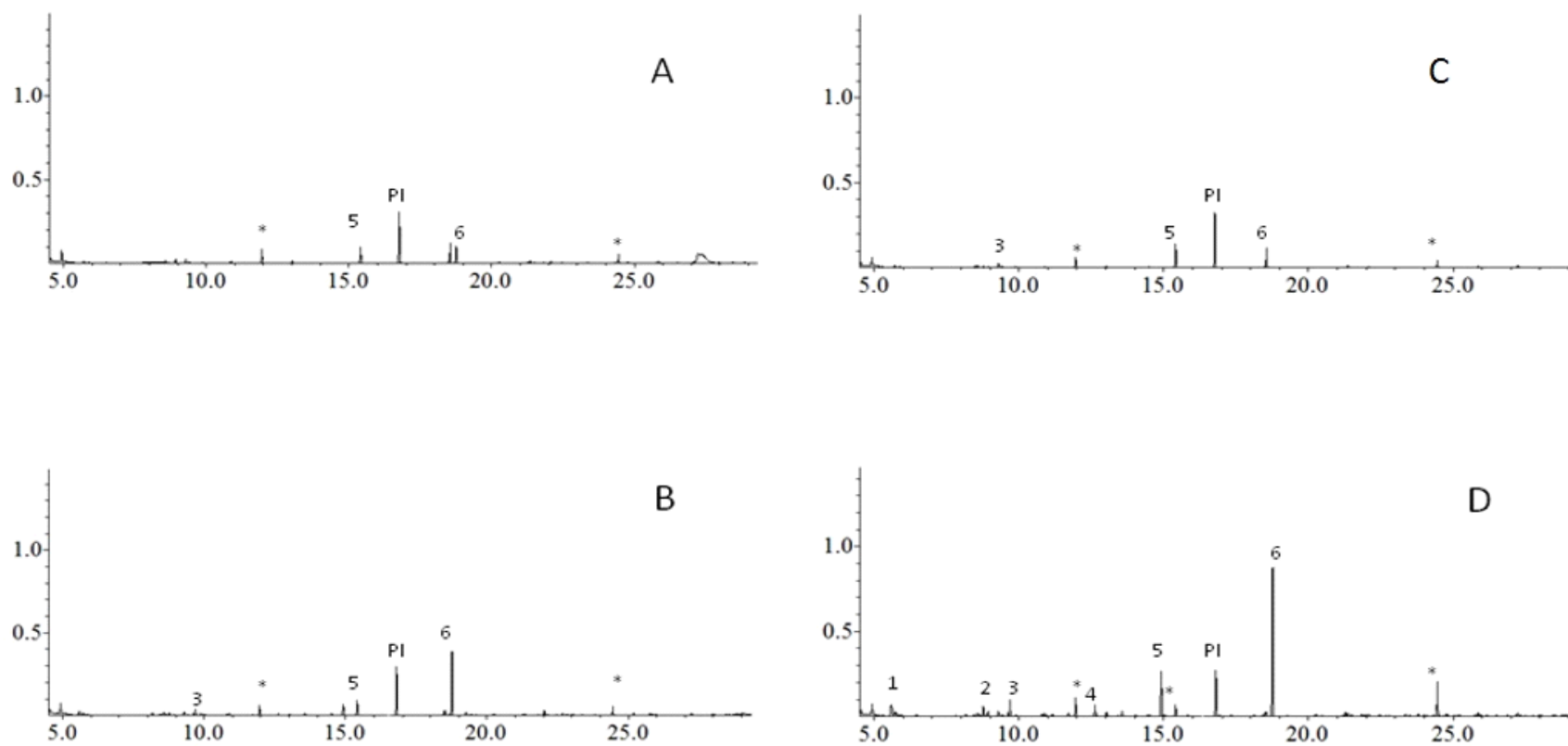


Figura 1. Cromatograma típico de cultivar isogênica (A) e transgênica controle (C), isogênica danificada (B) e soja transgênica tolerante ao glifosato (D) sujeita a alimentação de *C. includens*. Os principais compostos induzidos por herbivoria são: 1) (Z) 3-hexen-1-ol; 2) (Z)-3-acetato de hexenila; 3) (Z)- β -ocimeno; 4) composto não-identificado 2; 5) indol; 6) α -farneseno. * contaminante.

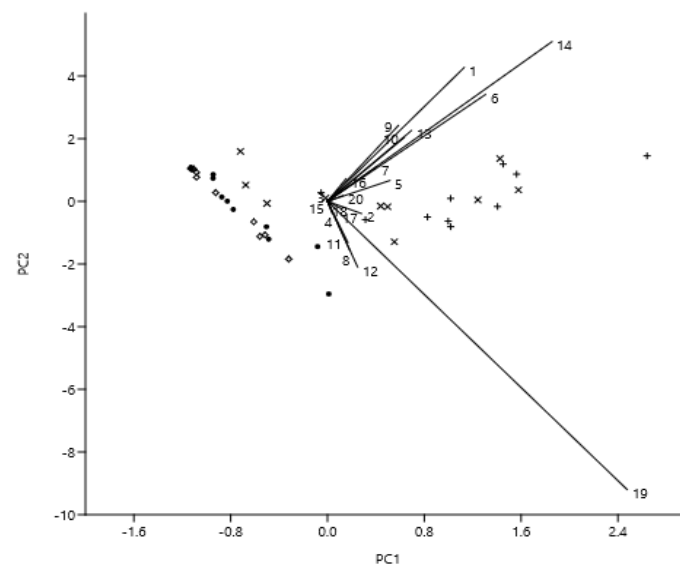


Figura 2. Scores das plantas individuais de soja isogênica controle (●), isogênica danificada (x), transgênica controle (◇) e danificada por *C. includens* (+), e compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos projetados no primeiro (PC1) e segundo componente principal (PC2). Os vetores são os loadings (pesos) de cada composto (numerados) e o comprimento representa a magnitude relativa de sua importância nos diferentes tratamentos. COVs 1) (Z)-3-Hexen-1-ol, 2) 1-octen-3-ol, 3) 3-octanona, 4) Octanal, 5) (Z)-3-acetato de hexenila, 6) (Z)- β -ocimeno, 7) β -linalol, 8) Nonanal, 9) Composto não identificado 1, 10) Composto não identificado 2, 11) MeSa, 12) Decanal, 13) (Z)-3hexenil-2-metilbutirato, 14) Indol, Composto não identificado 3, 16) (Z)-Jasmona, 17) β -cariofileno, 18) α -cariofileno, 19) α -Farneseno, 20) TMTT.

4.3 Preferência de *M. rubens* aos voláteis de soja: Fêmeas acasaladas de *M. rubens* discriminaram entre os voláteis emitidos por plantas controle e plantas danificadas por *C. includens*, preferindo os voláteis induzidos após a herbivoria na isogênica ($\chi^2 = 9$; $P = 0,003$) e transgênica ($\chi^2 = 12,1$; $P < 0,001$). Quando foram comparados voláteis induzidos pelas duas variedades, *M. rubens* mostrou uma preferência significativa pelos odores induzidos nas plantas transgênicas ($\chi^2 = 10,53$; $P = 0,001$) (Figura 3).

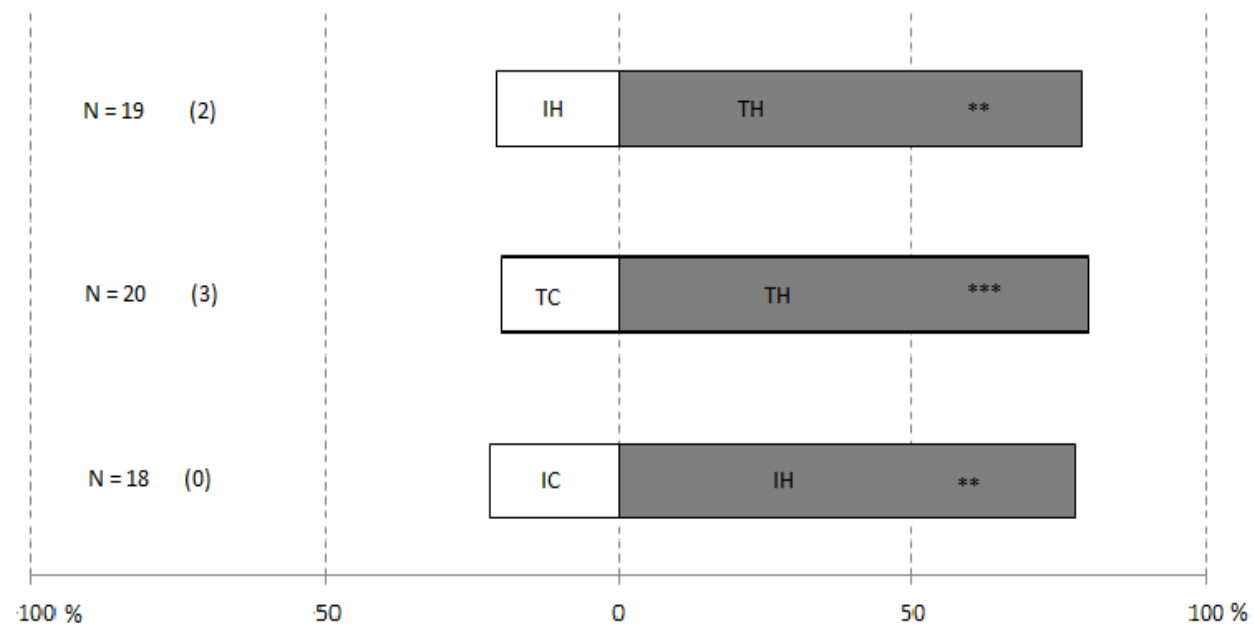


Figura 3. Preferência de fêmeas acasaladas de *Meteorus rubens* para os odores de plantas não danificadas (C) danificadas por *Chrysodeixis includens* (H) transgênicas (T) e cultivar isogênica (I), e aos odores de plantas danificadas por herbivoria de ambas linhagens. O asterisco mostra o nível de significância $P < 0.05$ **, $P < 0.01$ ***. Números à direita mostram o total de insetos que responderam para cada tratamento (N). O número de insetos que não responderam está entre parênteses.

5. DISCUSSÃO

Sob condições controladas de luz e temperatura, as emissões de COVs induzidos pela herbivoria de *C. includens* são aumentadas em plantas transgênicas que expressam tolerância ao glifosato em comparação com a isogênica. Os métodos convencionais de melhoramento de plantas podem resultar na variação de COVs induzidos por herbívoros entre genótipos dentro de uma espécie vegetal (Degen et al. 2004, Kappers et al. 2011, Kariyat et al. 2012). Isto é também verdade para a transformação genética de plantas que expressam a proteína de *Bacillus thuringiensis* ou resistência ao patógeno *Venturia inaequalis* (Turlings et al. 2005, Dean et al. 2006, Vogler et al. 2010). Alterações quantitativas na emissão de COVs podem alterar o comportamento alimentar de herbívoros (Dean et al. 2006) assim como o aumento da alimentação pode resultar em maiores emissões de COVs (Girling et al. 2011). No caso de plantas transgênicas, provavelmente ocorrem mudanças na alocação de carbono (Turlings et al. 2005, Zonetti et al. 2012). Embora a quantificação de tecido vegetal consumido por *C. includens* não tenha sido realizada, não foi encontrada qualquer evidência de ganho ou perda de peso de larvas mediante a alimentação com folhas de soja transgênica em comparação com a isogênica. Isto sugere que a preferência de alimentação de larvas não foi alterada, e por consequência, os resultados aqui relatados se devem às diferenças no modo como plantas transgênicas e convencionais respondem aos herbívoros, pelo menos à *C. includens*. Os mecanismos por trás dessa resposta permanecem desconhecidos e merecem uma investigação mais aprofundada.

COVs induzidos por herbívoros são sinais confiáveis para parasitoides (Hare 2011, Clavijo McCormick et al. 2012) e estes inimigos naturais podem conseguir identificar a variação genética natural em misturas de voláteis emitidos. Os resultados dos bioensaios mostraram que *M. rubens* é capaz de discriminar entre COVs emitidos constitutivamente e induzidos por *C. includens* em ambas as linhagens. A herbivoria, tanto nas plantas transgênicas como isogênicas, resultou em mudanças qualitativas e quantitativas na mistura de COVs induzidos. Possivelmente o aumento em compostos individuais ou alterações nas proporções de COVs são responsáveis pela discriminação (Bruce et al. 2005). No entanto, ao testar *M. rubens* para discriminar entre os COVs induzidos por herbívoros emitidos por plantas transgênicas e os que são emitidos pelas isogênicas, houve uma preferência clara das vespas para os odores da linha transgênica. Interações planta-inseto mediada por COVs são complexas, e a preferência de inimigos naturais para genótipos particulares dentro uma espécie de

planta pode ocorrer devido a um aumento na emissão de alguns compostos. Sabe-se que os inimigos naturais podem responder de forma diferente a COVs induzidos, dependendo da quantidade de compostos individuais ou o total emitido pela planta (Horiuchi et al. 2003, Girling et al. 2011, Shiojiri et al. 2012). Por exemplo, os ácaros predadores *Phytoseiulus persimilis* são mais atraídos para os odores emitidos por plantas de pepino infestadas com sua presa *Tetranychus urticae* a partir de castas que emitem grandes quantidades de (Z) β -ocimeno, TMTT e outros dois compostos ainda não identificados (Kappers et al. 2011). Em nosso estudo, houve diferença no perfil de voláteis emitidos por plantas transgênicas quando comparados com os diferentes grupos. É evidente que estas plantas emitiram maiores quantidades de α -farneseno, indol, β -ocimeno e (Z)-3-hexen-1-ol. Por consequência, os nossos resultados sugerem que as alterações nas concentrações destes compostos podem ter modificado a preferência das vespas. Sendo este o primeiro estudo que avalia a resposta comportamental do parasitoide neotropical *M. rubens* para voláteis de planta, portanto, nada se sabe sobre sua resposta inata ou a sua capacidade para a aprendizagem associativa. Aprendizagem associativa é um processo importante no comportamento de forrageamento de parasitoides e sua capacidade de aprender lhes permite distinguir entre voláteis específicos, aumentando o seu sucesso de forrageamento (De Jong e Kaiser 1991). Parasitoides especialistas dependem fortemente de estímulos derivados do hospedeiro que provocam respostas invariáveis, e, portanto, são provavelmente influenciados pelo aprendizado associativo (Clavijo McCormick et al. 2012). Em contraste, parasitoides generalistas, como *M. rubens*, têm de lidar com misturas de COVs variáveis, pouco influenciados pela aprendizagem associativa (Ngumbi et al. 2012).

De um ponto de vista ecológico, nossos resultados sugerem que o comportamento alimentar de um herbívoro e interações tritróficas mediada por COVs não são perturbados pela modificação de plantas que expressam tolerância ao glifosato no sistema modelo estudado. Com base nisso, embora não tenha sido extensivamente testado, pode-se prever que não haveria um efeito direto sobre o desempenho dos parasitoides. Do ponto de vista agrícola, nossos resultados sugerem que *M. rubens* teria mais facilidade de encontrar o hospedeiro em campos de soja transgênica sobre os campos de soja convencional, o que é interessante uma vez que campos de soja transgênicas e convencionais podem ser encontrados em áreas de cultivo no Sul do Brasil. No entanto, uma vez que a expressão genética dentro e entre as linhas

convencionais e transgênicas podem existir (Chen et al. 2008) mais estudos precisam ser conduzidos com outras linhas para compreender se esses resultados podem ser generalizados.

6. REFERÊNCIAS

Arimura G, Matsui K, Takabayashi J (2009) Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol.* 50: 911-923

Arruda MAZ, Azevedo RA, Barbosa HS, Mataveli LRV, Oliveira SR, Arruda SCC, Grato PL (2013) Comparative Studies Involving Transgenic and Non-Transgenic Soybean: What is Going On? In Board J (ed) *A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*. Intech press. Croácia. pp. 583-613 <http://dx.doi.org/10.5772/52212>

Brandão AR, Barbosa HS, Arruda MAZ (2010) Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *J Proteomics* 73(8): 1433-1440

Bruce TJ, Wadhams LJ, Woodcock CM (2005) Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci.* 10: 269-274

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland

Bueno RCOF, Parra JRP, Bueno AF, Moscardi F, Oliveira JRG, Camillo MF (2007) Sem barreira. *Rev Cultivar* 93: 12-15

Campo CBH, Oliveira EB, Moscardi F (1985) Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Embrapa CNPSo 23p

Chen Y, Schmelz EA, Wäckers F, Ruberson JR (2008) Cotton plant, *Gossypium hirsutum* L., defense in response to nitrogen fertilization. *J Chem Ecol* 34:1553–1564 doi:10.1007/s10886-008-9560-x

Clavijo McCormick AL, Unsicker S Gershenzon J (2012) The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends Plant Sci.*, 17(5), 303-310. doi:10.1016/j.tplants.2012.03.012.

Dean JM, De Moraes CM (2006) Effects of genetic modification on herbivore-induced volatiles from maize. *J Chem Ecol* 32: 713–724

Degen T, Dillmann C, Marion-Poll F, Turlings TCJ (2004) High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. *Plant Physiol* 135: 1928-1938

De Jong R, Kaiser L (1991) Odor learning by *leptopilina boulardi* a specialist parasitoid hymenoptera eucoilidae. *J Insec Behav* (4) 743-750

Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I (2006) Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25:417-440.

Fehr W, Caviness C, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci* 11: 929-931

Garcia-Villalba R, Leon C, Dinelli G, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A, Garcia-Canas V (2008). Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1195(1-2): 164-173

Girling RD, Stewart-Jones A, Dherbecourt J, Staley JT, Wright DJ, Poppy GM (2011) Parasitoids select plants more heavily infested with their caterpillar hosts: a new approach to aid interpretation of plant headspace volatiles. *Proc. R. Soc. B.* 278, 2646–2653.

Hare JD (2011) Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annu Rev Entomol* 56: 161-180

Hermann KM, Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 473–503

Horiuchi JI, Arimura GI, Ozawa R (2003) A comparison of the responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to volatiles emitted from lima bean leaves with different levels of damage made by *T. urticae* or *Spodoptera exigua* (Lepidoptera). *Appl Entomol and Zool* 38: 109-116.

Kaplan I (2012) Trophic complexity and the adaptive value of damage-induced plant volatiles. *PLOS Biol* 10(11): e1001437

Kappers IF, Aharoni A, van Herpen TWJM, Luckerhoff LLP, Dicke M, Bouwmeester HJ (2005) Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science* 309: 2070–2072

Kappers IF, Hoogerbrugge H, Bouwmeester HJ, Dicke M (2011) Variation in herbivory-induced volatiles among cucumber (*Cucumis sativus* L.) varieties has consequences for the attraction of carnivorous natural enemies. *J Chem Ecol* 37: 150–160

Karban R, Baldwin IT (1997) *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.

Kariyat R R , Mauck K, De Moraes CM, Stephenson AG, Mescher MC (2012) Inbreeding alters volatile signaling phenotypes and influences tritrophic interactions in horsenettle (*Solanum carolinense* L.) *Ecol Lett* 15: 301-309

Ngumbi E, Jordan M, Fadamiro H (2012). Comparison of associative learning of host-related plant volatiles in two parasitoids with different degrees of host specificity, *Cotesia marginiventris* and *Microplitis croceipes*. *Chemoecol* 22 (4): 207-215

Mithöfer A, Boland W (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 431-450

Parra JRP (2001) Técnicas de Criação de Insetos para Programas de Controle Biológico. FEALQ, Piracicaba

Shiojiri, K., Ozawa, R., Matsui, K., Sabelis, M.W. and Takabayashi, J. (2012) Intermittent exposure to traces of green leaf volatiles triggers a plant response. *Sci. Rep.* 2: 378. doi: 10.1038/srep00378

Turlings TC, Jeanbourquin PM, Held M, Degen T (2005) Evaluating the induced-odour emission of a Bt maize and its attractiveness to parasitic wasps. *Transgenic Res* 14: 807-816

Turlings TCJ, Ton J (2006) Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odors to enhance the control of agricultural pests. *Curr Opin Plant Biol* 9: 421–427

Turlings TCJ, Wäckers FL (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-damaged plants. In: Cardé RT, Millar J (eds) *Advances in Insect Chemical Ecology*. University Press, Cambridge, pp 21-75

Vet LE, Dicke MM (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu Rev Entomol* 37: 141-172

Vogler U, Rott AS, Gessler C, Dorn S (2010) Comparison between volatile emissions from transgenic apples and from two representative classically bred apple cultivars. *Transgenic Res* 19: 77-89

Zonetti PC, Suzuki LS, Bonini EA, Ferrarese MLC, Ferrarese-Filho O (2012) High Temperatures on root growth and lignifications of transgenic-resistant soybean. *Agrociencia* 46: 557-565

CAPÍTULO 3

PISTAS OLFATIVAS UTILIZADAS NO FORRAGEAMENTO DE
***Trichogramma pretiosum* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE): O**
PAPEL DOS FEROMÔNIOS CONTRA COVs INDUZIDOS POR OVIPOSIÇÃO

PISTAS OLFATIVAS DURANTE O FORRAGEAMENTO DE *Trichogramma pretiosum* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE): O PAPEL DOS FEROMÔNIOS CONTRA COVs INDUZIDOS POR OVIPOSIÇÃO

Resumo: Parasitoides utilizam sinais químicos, físicos e visuais para encontrar seus hospedeiros, sendo os químicos mais comumente utilizados. Os sinais sutis emitidos pela presença dos ovos, associado ao tempo limitado em que estes permanecem viáveis para o parasitismo de algumas espécies, determinam a necessidade de otimização da exploração de pistas disponíveis que levam ao sucesso do parasitismo. Até agora, poucos estudos foram capazes de comprovar a indução de compostos apenas pela oviposição dos insetos e a utilização destes voláteis por parasitoides na sua localização. Neste estudo, avaliamos se a oviposição de *Spodoptera frugiperda* induz a produção de voláteis em soja transgênica e sua isogênica e se estes atraem o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* em testes de olfatômetro. Os resultados revelaram que não foram detectadas mudanças no perfil de voláteis de soja após a oviposição de *S. frugiperda* e que estes voláteis não atraíram fêmeas do parasitoide. Além disso, foi observado que os parasitoides foram atraídos pelo composto majoritário do feromônio sexual sintético de *S. frugiperda*, comprovando que, de fato, a localização do hospedeiro se dá através de infoquímicos liberados pela fase adulta do hospedeiro e não por voláteis de plantas induzidos por oviposição.

Palavras-Chave: desvio infoquímico; feromônio sexual; localização do hospedeiro; parasitoides

OLFACTORY CUES USED BY DURING FORAGING THE *Trichogramma pretiosum* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE): THE ROLE OF PHEROMONES AGAINST VOCs INDUCED BY OVIPOSITION

Abstract: Parasitoids use chemical, physical and visual cues to find their hosts being the first one the most commonly used. The subtle signals emitted by plants due to the presence of eggs, associated with the limited time that these eggs remain viable for the parasitism of some species determine the necessity to optimize the exploitation of available clues by parasitoids. Until now, few studies were able to prove the induction of compounds caused only by the oviposition of insects and the use of these volatiles by parasitoids to locate them. In this study, we evaluated whether the oviposition of *Spodoptera frugiperda* induces the production of volatiles in transgenic and isogenic soybean plants, and if these volatiles are attractive to the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. Results revealed that there were no significant changes in the volatiles' profile of soybean plants after the oviposition of *S. frugiperda* and that these volatiles did not attract female egg parasitoids in olfactometer tests. Moreover, parasitoids were attracted to the majoritary compound synthetic pheromone emitted by *S. frugiperda* proving that the location of the host is, indeed, accomplished by female parasitoids using infochemicals released by the host.

Key words: infochemical detour; sexual pheromone; host searching behavior; parasitoids

1. INTRODUÇÃO

Para superar a dificuldade de encontrar o hospedeiro em meio a um ambiente tão complexo, os parasitoides desenvolveram mecanismos de busca que os guiam, utilizando sinais químicos, físicos e visuais provenientes ou associados aos hospedeiros, sendo os químicos mais comumente utilizados. Parasitoides de ovos encontram maiores dificuldades nessa busca, uma vez que a pequena biomassa dos seus hospedeiros faz com que sinais sutis da sua presença sejam emitidos (Vet e Dicke 1992). Nas últimas décadas tem-se demonstrado a importância dos voláteis de planta na localização do hospedeiro por parasitoides (Pickett et al 1997), já que são emitidos em grandes quantidades e podem ser detectados a longas distâncias (Vet e Dicke 1992).

A resposta das plantas contra a herbivoria de insetos e a exploração destes infoquímicos por parasitoides tem sido relatada nas mais diferentes culturas (Dicke e Van Loon 2000, Arimura et al. 2005, Dudareva et al. 2006, D'Alessandro e Turlings 2006, Mumm e Hilker 2006, Hilker e Meiners 2010). Estes estudos mostram que a mudança no perfil de voláteis após a herbivoria pode ocasionar tanto a indução de novos compostos como a mudança na proporção dos voláteis, guiando inimigos naturais aos seus hospedeiros. Mais recentemente, foi demonstrado que a oviposição dos herbívoros também pode afetar a emissão de voláteis nas plantas. Peñaflor et al. (2011) observaram que a oviposição de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) diminuiu a emissão de linalol em milho em comparação com plantas controle. Fatouros et al. (2012) também encontraram uma diminuição na emissão de COVs em plantas de mostarda negra após a oviposição de *Pieris brassicae* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pieridae) e *Mamestra brassicae* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Noctuidae). Pinto Zevallos et al. (2013) observaram a diminuição na emissão de (Z)-3-hexen-1-ol e a supressão da emissão de (E)-2-hexenylacetate em *Veronica spicata* (Lamiales: Plantaginaceae) após a oviposição de *Melitaea cinxia* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Nymphalidae). Uma explicação possível é que a densidade da postura diminui a atividade fotossintética da folha, reduz a difusão de CO₂ no mesófilo e causa deficiência de água, afetando a emissão de voláteis (Schröder et al. 2005, Velikova et al. 2010).

No entanto, tem-se encontrado certa dificuldade em comprovar a emissão de voláteis induzidos em decorrência exclusiva da oviposição. A razão para a descrição de poucos sistemas de defesa induzida pela oviposição parece estar relacionada ao comportamento particular de oviposição dos insetos na planta. Antes de depositarem seus ovos, muitas espécies danificam a superfície foliar com o aparelho bucal ou com o

ovipositor, fazendo com que a substância elicitora presente na secreção do oviduto entre em contato com o interior do tecido vegetal. Sendo assim, não se pode afirmar se a indução ocorre devido à substância elicitora presente no ovipositor ou nos ovos (Meiners e Hilker 2000, Mumm et al. 2003). De acordo com Meiners e Hilker (2000), sinomônios só seriam liberados quando a oviposição envolve dano mecânico nos tecidos da planta. No entanto, estudos recentes têm indicado que a própria deposição de ovos, sem ferir, também pode aumentar ou reduzir a emissão de voláteis, com atração de insetos (Bruce et al. 2010, Tamiru et al. 2011, Tamiru et al. 2012).

Semioquímicos provenientes do corpo do adulto (como os presentes nas escamas) também são frequentemente utilizados na localização por parasitoides de ovos e, segundo Parker et al. (1971), atuam como arrestantes, mantendo o parasitoide na área em que está o hospedeiro. Parasitoides também exploram a comunicação entre indivíduos da espécie hospedeira, como observado em vários parasitoides de ovos que são atraídos por feromônio sexual do hospedeiro, já que esse indica que existe ou haverá ovos da espécie na área (Vinson 1984, Altieri et al. 1981, Lewis e Nordlund et al. 1985, Noldus e van Lenteren 1985, Gazit et al. 1996). Há muitos estudos que relatam a importância de odores provenientes dos estágios não alvo do hospedeiro para os parasitoides de ovos (desvio infoquímico) (Colazza et al. 1997). Um dos primeiros exemplos de desvio infoquímico foi dado por Noldus (1989), que menciona que o parasitoide de ovos do gênero *Trichogramma* se utiliza do feromônio sexual de mariposas para encontrar fêmeas propícias ao acasalamento, e por consequência, seus ovos.

Trichogramma pretiosum (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é um microhimenóptero generalista que parasita ovos de diversas espécies de lepidópteros de importância agrícola e tem sido criado e liberado massalmente como parte de programas de manejo integrado de pragas. O objetivo deste trabalho foi verificar se a oviposição de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) modifica o perfil de voláteis emitidos em duas variedades de soja (uma transgênica e a isogênica), influenciando o comportamento de busca do hospedeiro por fêmeas de *T. pretiosum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar se a oviposição de *Spodoptera frugiperda* modifica o perfil de voláteis emitidos por soja, influenciando o comportamento de busca do hospedeiro por fêmeas de *T. pretiosum*.

2.2 Específicos

- Analisar se há mudança no perfil de voláteis emitidos por soja após a oviposição de *S. frugiperda*,
- Analisar o comportamento do parasitoide de ovos *T. pretiosum* frente a voláteis de soja controle e após a oviposição de *S. frugiperda*,
- Analisar se o componente majoritário do feromônio sexual de *S. frugiperda* exerce atração sobre *T. pretiosum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de plantas: Plantas de soja CD 202 e CD 202 RR foram cultivadas em substrato comercial (Tropstrato, Vida Verde, São Paulo, Brasil). A semeadura foi realizada individualmente em bandejas de germinação. As plantas foram mantidas em sala climatizada com um fotoperíodo de 14:10 (L: E) e regadas conforme necessidade, até que foram utilizadas nos experimentos (estágio V3).

3.2 Criação de *S. frugiperda*: A criação foi mantida em BOD com temperatura controlada a 25°C, 70% UR e fotoperíodo 14:10 (L:E). Os adultos foram mantidos em tubos de PVC (15 cm de altura), com a parte superior coberta com uma gaze apertada com um elástico. Os adultos foram alimentados com mel diluído. O interior da gaiola foi envolvido com papel sulfite como substrato para oviposição. A cada dois ou três dias o papel foi retirado e os ovos foram transferidos para caixas de plástico com dieta artificial à base de feijão (Parra 2001). Ao atingirem o 3º ínstar, as larvas foram individualizadas em copos contendo dieta artificial para evitar o canibalismo.

3.3 Manutenção de *T. pretiosum* em laboratório: Cartelas do parasitoide *T. pretiosum* foram adquiridas da empresa BUG (Piracicaba, São Paulo, Brasil) e foram mantidos em tubos de vidro contendo um filete de mel para sua alimentação.

3.4 Coleta e análise de voláteis: Plantas de soja de ambas as linhagens (CD 202 e CD 202 RR) foram colocadas separadamente em uma gaiola de acrílico com 5 fêmeas acasaladas para oviposição. Após duas escotofases as plantas foram verificadas e, as que continham massa de ovos foram utilizadas para coleta de voláteis. Quatro plantas, uma de cada tratamento, foram simultaneamente colocadas dentro de câmaras de vidro de 1 L conectadas por uma entrada de ar. Para evitar a coleta de voláteis induzidos por dano mecânico durante a manipulação das plantas, a coleta de voláteis foi iniciada 12 horas após a montagem do sistema. A coleta e análise dos voláteis seguiu a metodologia descrita por Martins et al. (2013).

3.5 Preferência de *T. pretiosum* aos voláteis de soja e componente majoritário do feromônio sexual de *S. frugiperda*: A resposta de *T. pretiosum* aos voláteis de soja com ovos de *S. frugiperda* foi testada em olfatômetro do tipo “Y” ($\varnothing = 2$ cm; braço principal = 18 cm; braços menores = 13 cm). Um fluxo de ar de 1 L/min umidificado e filtrado foi igualmente dividido em duas partes, contendo as fontes de odor. Assim, cada braço do olfatômetro recebeu um fluxo de ar de 0,5 L / min. Cada fonte de odor consistiu de um pedaço de papel filtro (1 cm x 1cm) contendo 20 μ l de extrato de planta de soja em estágio V3 controle ou após a oviposição de *S. frugiperda*, tal como descrito acima. Fêmeas com idade de 2-3 dias foram colocadas individualmente no início do braço principal e deixou-se escolher entre as fontes de odor. Considerou-se que um inseto tinha respondido quando passou o ponto médio de um dos braços e lá permaneceu por pelo menos cinco segundos. Quando não houve escolha por um dos braços durante um período de 10 minutos, foi considerado como não resposta e estes insetos foram excluídos da análise dos dados. A cada observação, o papel filtro foi trocado e o olfatômetro foi girado 180°. Os experimentos foram conduzidos das 9:00-17:00 horas a 25°C. Os tratamentos foram: a) extrato de plantas controle vs. extrato plantas com massa de ovos (isogênica); b) extrato de plantas controle vs. plantas com massa de ovos (transgênica); 3) extrato de plantas com massa de ovos isogênica vs. plantas com massa de ovos transgênica. Testes com o componente majoritário do feromônio sexual de *S. frugiperda* (Z7- 12Ac) foram realizados utilizando 5 μ l de extrato sintético contra a mesma quantidade de solvente hexano.

3.6 Análises estatísticas: Os COVs individuais foram transformados em $\log(X + 1)$ e submetidos a uma Análise de Componentes Principais (PCA). Uma análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de contraste de médias foi então realizada para esses PCs que explicavam a principal variação percentual. A preferência de *T. pretiosum* aos voláteis foi analisada através da realização de um teste χ^2 . As análises foram realizadas no Ambiente "R" (R Development Core Team, 2006).

4. RESULTADOS

4.1 Voláteis de soja liberados após a oviposição de *S. frugiperda*: Os COVs liberados por soja após a oviposição estão apresentados na tabela 1. O PC1 explicou 75,14% das variações observadas, entretanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($P= 0,46$). Os cromatogramas típicos de cada tratamento estão apresentados na Figura 1.

Tabela 1: Emissões de compostos orgânicos voláteis individuais (ng/g ps⁻¹ 24h⁻¹) por plantas de soja transgênicas e isogênicas controle e após a oviposição de *Spodoptera frugiperda* (média ± E.P.M)

Compostos	R.T	K.I.(c)	Plantas controle		Plantas após a oviposição de <i>S. frugiperda</i>			
			Isogênica (IC)	Transgênica (TC)	Isogênica (CH)		Transgênica (TH)	
(Z)-3-Hexen-1-ol	5.581	851	nd	0,01 ±0,01	0,02 ± 0,02		1,01 ± 0,50	
1-octen-3-ol	8.155	978	nd	nd	nd		0,01 ± 0,01	
3-octanona	8.293	985	nd	0,01 ±0,01	nd		nd	
Octanal	8.668	1003	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02		0,02 ± 0,01	
(Z)-4-acetato de hexenila	8.757	1007	0,05 ± 0,04	0,15 ± 0,07	0,04 ± 0,03		0,75 ± 0,37	
(Z) β- ocimeno	9.680	1051	0,16 ± 0,11	0,29 ± 0,23	0,12 ± 0,11		0,52 ± 0,32	
β- linalol	10.796	1100	nd	nd	nd		nd	
nonanal	10.877	1106	0,24 ± 0,10	0,19 ± 0,03	0,14 ± 0,07		0,12 ± 0,01	
Não identificado 1	11.711	1144	nd	nd	nd		nd	
Não identificado 2	12.608	1235	nd	nd	nd		nd	
MeSa	12.878	1201	0,13 ± 0,05	0,15 ± 0,09	0,26 ± 0,16		0,69 ± 0,23	
Decanal	13.007	1206	0,48 ± 0,22	0,26 ± 0,10	0,15 ± 0,11		0,14 ± 0,06	
(Z)-3Hexenil-2- metilbutirato	13.549	1234	nd	nd	nd		nd	
indol	14.905	1304	0,07 ± 0,05	0,90 0,87	nd		0,64 ± 0,42	

Composto	T.R	I. K. (c)	Plantas controle		Plantas danificadas por <i>C. includens</i>	
			Isogênica (IC)	Transgênica (TC)	Isogênica (IH)	Transgênica (TH)
Não identificado						
3	16.344	1380	0,03 ± 0,01	nd	0,09 ± 0,07	0,04 ± 0,01
(Z) jasmona	16.846	1406	nd	nd	nd	
β- cariofileno	17.306	1433	nd	0,04 ± 0,04	nd	nd
α- cariofileno	17.921	1454	nd ± 0,00	0,01 ± 0,01	nd	nd
α- farneseno	18.731	1515	2,34 ± 1,54	3,54 ± 3,23	1,00 ± 0,47	6,15 ± 2,74
TMTT	19.928	1584	0,03 ± 0,01	0,12 ± 0,11	0,04 ± 0,03	0,30 ± 0,14

E.P.M. = Erro padrão da média

T.R = Tempo de retenção

I.K. (c) = Índice de Kovats calculado

nd= não detectado

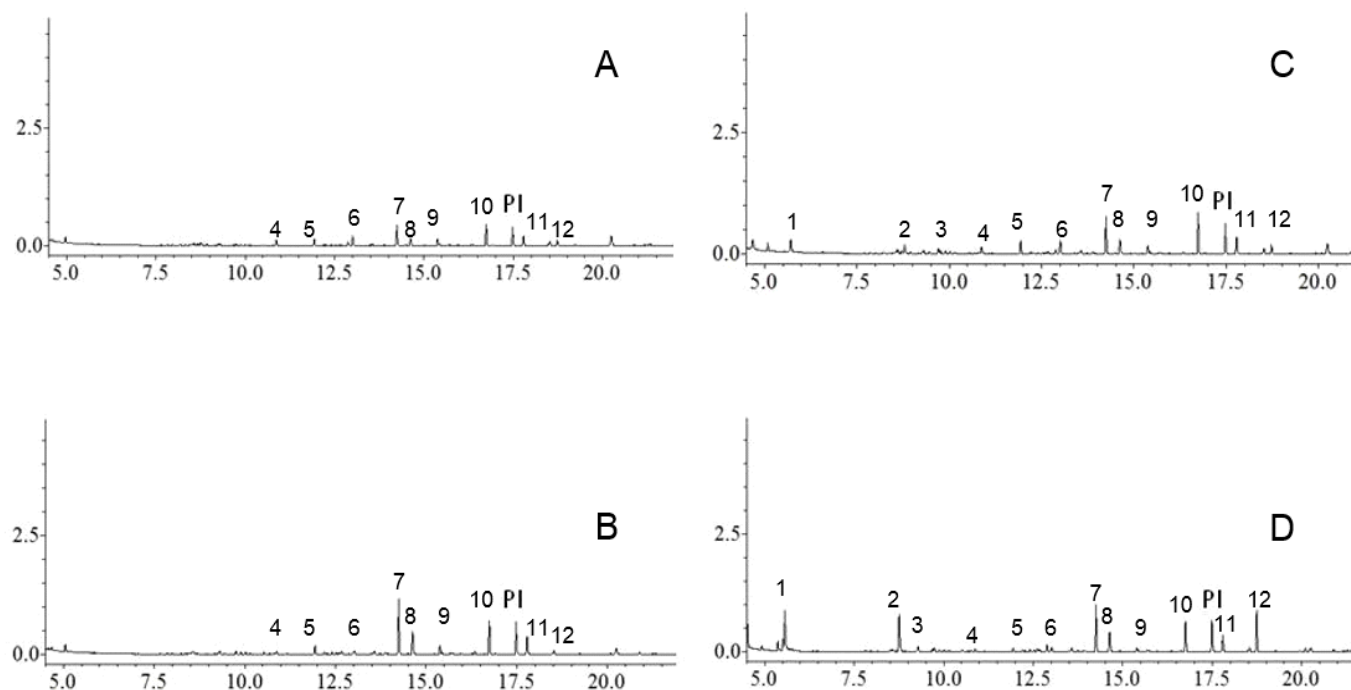


Figura 1. Cromatograma típico de cultivar isogênica (A) e transgênica controle (C), isogênica (B) e soja transgênica tolerante ao glifosato (D) após a oviposição de *Spodoptera frugiperda*. Os principais compostos emitidos foram: 1) (Z) 3-hexen-1-ol; 2) 1-octen-3-ol; 3) 4-hexen-1-ol; 4) (Z)- β -ocimeno; 5) β -linalol; 6) composto não-identificado 1; 7) composto não-identificado 2; 8) MeSA; 9) (Z)-3-hexenil-2- metilbutirato; 10) indol; 11) (Z)- jasmona; 12) α -farneseno.

4.2 Preferência de *T. pretiosum* aos voláteis de soja e composto majoritário do feromônio sexual de *S. frugiperda*: De 30 fêmeas de *T. pretiosum* testadas, não houve resposta aos extratos de plantas controle ou após a oviposição. Entretanto, ao testar o componente majoritário do feromônio sexual sintético de *S. frugiperda* contra o solvente hexano, mostraram atração significativa pelo componente majoritário do feromônio sexual de *S. frugiperda*(Z) 7- 12 Ac ($P = 0,000$) (N = 20).

5. DISCUSSÃO

O processo de seleção do hospedeiro por parasitoides de ovos envolve uma sequência mediada por estímulos físicos e químicos associados ao próprio hospedeiro, substrato e organismos associados (Vet e Dicke 1992). Os sinais sutis emitidos pela presença dos ovos, associado ao tempo limitado em que estes permanecem viáveis para o parasitismo de algumas espécies (Vinson 1998) determinam a necessidade de otimizar a exploração de pistas disponíveis que levam ao sucesso do parasitismo. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas nos perfis de voláteis emitidos por soja controle ou após a oviposição de *S. frugiperda*. É possível que alguns compostos tenham sido induzidos em pequenas quantidades, incapazes de serem detectadas pelos instrumentos utilizados. Entretanto, o fato dos parasitoides não terem sido atraídos por estes voláteis sugere que não houve modificação no perfil de voláteis emitidos após a oviposição ou que estes estímulos, por si só, não são utilizados na busca do hospedeiro.

Assim como no presente estudo, os parasitoides da espécie *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygastridae) também não foram atraídos por voláteis liberados por soja após a oviposição de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). Entretanto, houve atração por voláteis liberados após a oviposição mais a herbivoria destes pentatomídeos. Isso porque os percevejos se alimentam da mesma planta onde ovipositam, então os voláteis induzidos pela oviposição podem indicar a presença de ovos frescos. O mesmo não acontece com o sistema aqui estudado, onde os voláteis induzidos pela alimentação das lagartas só são liberados após a sua eclosão. Parece improvável que as pistas provenientes de plantas induzidas por oviposição sejam utilizadas por parasitoides que necessitam de ovos frescos por causa do atraso da resposta das plantas à oviposição (Vinson 2010).

Vários estudos reportam a atração de parasitoides do gênero *Trichogramma* pelo feromônio sexual liberado por fêmeas (Noldus 1991, Milonas et al. 2009, Fatouros et al. 2007). Curiosamente, alguns dos componentes do feromônio anti-afrodisíaco do gênero

Pieris (cianeto de benzila, MeSA e indol) que atraem vespas do gênero *Trichogramma* diretamente para fêmeas acasaladas são os mesmos emitidos comumente por plantas após a herbivoria (Fatouros et al. 2008, 2009).

Considerando que a idade dos ovos afeta diretamente o parasitismo e que o sucesso é alcançado quando ovos mais jovens são parasitados, é de se esperar que parasitoides de ovos criem estratégias para driblar o desencontro entre os sinais emitidos pelas plantas e a necessidade de se localizar em curto espaço de tempo. Sendo assim, a maioria dos parasitoides de ovos depende fortemente de estímulos derivados da fase adulta do hospedeiro, utilizando-se do feromônio sexual, de agregação ou ainda anti-afrodisíaco (Orr et al. 1986, Powell 1999, Austin et al. 2005, Fatouros et al. 2008, Colazza et al. 2010, Vinson 2010), como pode ser comprovado no presente estudo para a espécie *T. pretiosum*.

6. REFERÊNCIAS

Altieri MA, Lewis W J, Nordlund DA, Gueldner R C, Todd JW (1981) Chemical interactions between plants and *Trichogramma* wasps in Georgia soybean fields. *Prot Ecol* 3: 259- 263.

Arimura GI, Kost C, Boland W (20005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta* 1734:91-111.

Austin AD, Johnson NF, Dowton M (2005) Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastriid wasps. *Annu Rev Entomol* 50: 553-582.

Bruce TJA, Midega CAO, Birkett MA, Pickett JA, Khan ZR (2010) Is quality more important than quantity? Insect behavioural responses to changes in a volatile blend after stemborer oviposition on an African grass. *Biol Lett* 6: 314-317.

Colazza S, Peri E, Salerno G, Conti E (2010) Host Searching by Egg Parasitoids: Exploitation of Host Chemical Cues. In: Consoli FL, Parra JRP, Zucchi R, editors. *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. Dordrecht: Springer. 97-147.

Colazza S; Rossi MC; Clemente A (1997) Response of the egg parasitoid *Telenomus busseolae* (Gahan) to sex pheromone of *Sesamia nonagrioides* L (Lepidoptera). J Chem Ecol 23: 2437-2444.

D'Alessandro M, Turlings TCJ (2006) In situ modification of herbivore-induced plant odors: a novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps. Chem Senses 30: 739-753.

Dicke M, van Loon JJA (2000) Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. Entomol Exp Appl 97: 237-249.

Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I (2006) Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Crit Rev in Plant Scienc, Philadelphia, 25: 417- 440.

Fatouros NE, Broekgaarden C, Bukovinszky Kiss G, van Loon JJA, Mumm R, Huigens ME, Dicke M, Hilker M (2008) Male-derived butterfly anti-aphrodisiac mediates induced indirect plant defense. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 105: 10033-10038.

Fatouros NE, Pashalidou FG, Cordero WVA, van Loon JJA, Mumm R (2009) Anti-aphrodisiac compounds of male butterflies increase the risk of egg parasitoid attack by inducing plant synomone production. J Chem Ecol 35:1373–1381.

Fatouros NE, Bukovinszky Kiss G, Dicke M, Hilker M (2007) The response specificity of *Trichogramma* egg parasitoids towards infochemicals during host location. J Insect Behav 20: 53-65.

Fatouros NE, Dicke M, Mumm R, Meiners T, Hilker M (2008) Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. Behav Ecol 19: 677-689.

Fatouros NE, Lucas-Barbosa D, Weldegergis BT, Pashalidou FG, van Loon JJA, Dicke M, Harvey JA, Gols R, Huigens ME (2012) Plant volatiles induced by herbivore egg deposition affect insects of different trophic levels. PLoS ONE 7 (8): e43607.

Gazit Y, Lewis WJ, Tumlinson JH (1996) Arrestment of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) by a kairomone associated with eggs of its host, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Biol Control 6: 283–290.

Hilker M, Kobs C, Varama M, Scrank K (2002) Insect egg deposition induces *Pinus* to attract egg parasitoids. The J Exp Biol 205: 455-461.

Khan ZR, Midega CAO, Njuguna EM, Arnudavi DM, Wanyama JM, Pickett JA (2008) Economic performance of the ‘push-pull’ technology for stemborer and Striga control in smallholder farming systems in western Kenya. Crop Prot 27: 1084-1097.

Lewis WJ, Nordlund D A (1985) Behavior-modifying chemicals to enhance natural enemy effectiveness. In: Hoy MA, Herzog DC (eds), Biological control in agricultural IPM systems. Academic Press, Orlando, pp. 89-101.

Meiners T, Hilker M (2000) Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. J Chem Ecol 26: 221-232.

Milonas PG, Mazomenos BE, Konstantopoulou MA (2009) Kairomonal effect of sex pheromone components of two lepidopteran olive pests on *Trichogramma* wasps. Insect Sci 16:131-136.

Mumm R, Tiemann T, Varama M, Hilker M (2005) Choosy egg parasitoids: Specificity of oviposition-induced pine volatiles exploited by an egg parasitoid of pine sawflies. Entomol Exp et Appl 115: 217-225.

Noldus LPJJ (1989) Response of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* to the sex pheromone of its host *Heliothis zea*. Entomol Exp Appl 48: 293-300.

Noldus LPJJ, Potting RPJ, Barendregt HE (1991) Moth sex pheromone adsorption to leaf surface: bridge in time for chemical spies. Physiol Entomol 16: 329-344.

Noldus LPJJ, van Lenteren JC (1985) Kairomones for the egg parasite *Trichogramma evanescens* Westwood. Effect of volatile substances released by two of its hosts, *Pieris brassicae* L. and *Mamestra brassicae* L. J Chem Ecol 11: 781-791.

Orr DB, Russin JS, Boethel DJ (1986) Reproductive biology and behavior of *Telenomus calvus* (Hymenoptera: Scelionidae), a phoretic egg parasitoid of *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). Canadian Entomologist 118: 1063-72.

Parker FD, Lawson FR, Pinnell, RE (1971) Suppression of *Pieris rapae* using a new control system: Mass release of both the pest and its parasitoids. J Econ Entomol 64: 721-735.

Penaflor MFGV, Erb M, Robert CAM, Miranda LA, Werneburg AG (2011) Oviposition by a moth suppresses constitutive and herbivore-induced plant volatiles in maize. Planta 234: 207-215.

Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1997) Developing sustainable pest control from chemical ecology. Agriculture, Ecosystems and Environment 64:149-156.

Pinto-Zevallos DM, Hellen H, Hakola H, van Nouhuys S, Holopainen JK (2013) Phytochemistry Letters 6:653-656.

Powell W (1999) Parasitoid hosts. In: Hardie J, Minks AK (eds) Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 405- 27.

Schröder R, Forstreuter M, Hilker M (2005) A plant notices insect egg deposition and changes its rate of photosynthesis. Plant Physiol 138: 470-477.

Tamiru A, Bruce TJ, Midega CA, Woodcock CM, Birkett MA (2012) Oviposition induced volatile emissions from African smallholder farmers' maize varieties. J Chem Ecol 38: 231-234.

Tamiru A, Bruce TJA, Woodcock CM, Caulfield JC, Midega CAO (2011) Maize landraces recruit egg and larval parasitoids in response to egg deposition by a herbivore. *Ecol Lett* 14: 1075-1083.

Tooker JF, De Moraes CM (2005) Jasmonate in Lepidoptera eggs and neonates. *J Chem Ecol* 31: 2753-2759.

Velikova V, Salerno G, Frati F, Peri E, Conti E, et al. (2010) Influence of feeding and oviposition by phytophagous pentatomids on photosynthesis of herbaceous plants. *J Chem Ecol* 36: 629-641.

Vet LEM, Dicke M (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* 37: 141-172.

Vinson SB (2010) Nutritional ecology of insect egg parasitoids. In: Consôli FL, Parra JRP, Zucchi R (eds) *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. Springer, Dordrecht, pp. 25-55.

Vinson SB (1984) Parasitoid-host relationships. In: Cardé RT, Bell WJ (eds) *Chemical Ecology of Insects*. Chapman & Hall, New York, pp. 205-233.

Vinson SB (1984) How parasitoids locate their hosts: a case of insect espionage. In: Lewis T (ed) *Insect Communication*. Academic Press, London, pp. 325-48.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível concluir que não há diferenças significativas no perfil de voláteis constitutivos emitidos pela soja CD 202 RR e sua isogênica. Entretanto, como já descrito por outros autores, o metabolismo destas plantas parece ser alterado, uma vez que *A. gemmatalis* preferiu ovipositar e ganhou mais peso com plantas transgênicas. O efeito da inserção do gene de tolerância ao glifosato no metabolismo de outros compostos merece um estudo mais aprofundado, por isso novos estudos estão sendo realizados para avaliar a mudança nos flavonoides produzidos por soja RR e sua isogênica. Também foi observado que ocorrem mudanças no perfil de voláteis emitidos após a herbivoria das espécies desfolhadoras *A. gemmatalis* e *C. includens*. Observou-se que, nas mesmas condições de herbivoria, não houve diferença qualitativa nos voláteis induzidos por ambas espécies, mas a quantidade de voláteis emitidos após a herbivoria de *A. gemmatalis* foi maior do que aqueles emitidos após a herbivoria de *C. includens*. Então, como estas diferenças poderiam ser explicadas?

Em campo, é possível observar que os danos causados por *A. gemmatalis* são muito mais severos. Esta espécie consome a área foliar total da planta, enquanto que *C. includens* causa apenas um rendilhamento das folhas, preservando as nervuras foliares. Em laboratório, observa-se que, apesar do pequeno dano causado por larvas de primeiro ínstar das duas espécies, *A. gemmatalis* realiza perfurações na folha, enquanto que *C. includens* apenas a raspa. Pode-se inferir então, que as maiores emissões de voláteis observadas são causadas pelo maior dano causado por *A. gemmatalis* à planta.

Outra questão interessante diz respeito à diferença na discriminação de odores por *P. nigrispinus* e *M. rubens*. Qual seria o motivo de *M. rubens* conseguir discriminar entre os voláteis de soja transgênica e isogênica danificadas e *P. nigrispinus* não?

Estudos sobre o comportamento de forrageamento de parasitoides indicam que a aprendizagem é um fenômeno comum nesse grupo, o que reforça o seu papel na modulação da sensibilidade da fêmea de várias espécies de parasitoides aos COVs induzidos por herbivoria. Contudo, pouco se tem estudado sobre o aprendizado associativo em predadores. Predadores, por necessitarem de maior quantidade de presas para o seu desenvolvimento, são menos influenciados por odores provenientes de plantas, já que estas pistas são mais fracas do que as emitidas pelo próprio herbívoro ou seus subprodutos. Já os parasitoides, que dependem fortemente da sincronia entre o seu ciclo de vida e o estágio de desenvolvimento do hospedeiro, precisam otimizar as pistas

disponíveis para sua localização, se utilizando também dos voláteis liberados pelas plantas para sua localização.

Outra questão a ser considerada é o modo como os dois inimigos naturais foram criados. Enquanto *M. rubens* foi proveniente de lagartas coletadas em campo, os insetos da espécie *P. nigrispinus* utilizadas vinham sido criados massalmente em laboratório e isso pode ter influenciado seu comportamento de busca. Sabe-se que a capacidade de percepção dos voláteis associados ao complexo planta-herbívoros pode ser prejudicada durante a criação massal de inimigos naturais e reduzir a eficiência de busca desses inimigos em campo. A maioria das criações massais de inimigos naturais, por questões práticas e financeiras, são feitas em laboratório com dietas artificiais ou hospedeiros alternativos. Esse modo de criação facilita e diminui os custos de produção de inimigos naturais, mas, pode comprometer a eficiência dos mesmos em campo, pois os estímulos aos quais estes inimigos estão submetidos numa criação massal são consideravelmente diferentes daqueles utilizados para buscar presas/hospedeiros em campo, que é o caso de *M. rubens*.

Com relação aos voláteis emitidos por soja após a oviposição de *S. frugiperda*, era esperado que houvesse uma mudança no perfil de voláteis em relação às plantas controle. Isso não ocorreu e, como consequência, não foi observada atração do parasitoide de ovos *T. pretiosum* por estes voláteis. Na literatura já existem vários relatos sobre a utilização de odores provenientes de fêmeas na localização de ovos do hospedeiro por várias espécies de *Trichogramma*, o que foi comprovado neste estudo, pois esta espécie foi atraída pelo componente majoritário do feromônio sexual de *S. frugiperda*.

Este estudo foi pioneiro ao verificar o efeito secundário da soja transgênica tolerante ao glifosato na comunicação química entre herbívoros praga da soja e seus inimigos naturais. Apesar de não ser possível extrapolar as considerações aqui colocadas para outros sistemas, uma vez que estes são dinâmicos e apresentam suas particularidades, este trabalho abre possibilidades para novos estudos de ecologia química em outros sistemas tritróficos para avaliar o efeito das plantas transgênicas tolerantes ao glifosato na comunicação inseto-planta.

REFERENCIAS GERAIS

Ali A, Luttrell R G, Pitre H N, Davis F M (1989) Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. *Environ Entomol* 18 (5): 881-885.

Altieri M A (1989) Agroecologia: as bases científicas da agricultura alternativa. Rio de Janeiro: PTA/FASE.

Altieri MA, Lewis W J, Nordlund DA, Gueldner R C, Todd JW (1981) Chemical interactions between plants and *Trichogramma* wasps in Georgia soybean fields. *Prot Ecol* 3: 259- 263.

Arab A, Bento JMS (2006) Plant Volatiles: New Perspectives for Research in Brazil. *Neotr Entomol* 35 (2): 151-158.

Arimura C, Kost G, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Bioch et Biophys Acta* 734(2): 91-111.

Arimura G, Matsui K, Takabayashi J (2009) Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol.* 50: 911-923.

Arimura GI, Kost C, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta* 1734:91-111.

Arruda MAZ, Azevedo RA, Barbosa HS, Mataveli LRV, Oliveira SR, Arruda SCC, Grato PL (2013) Comparative Studies Involving Transgenic and Non-Transgenic Soybean: What is Going On? In Board J (ed) A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships. Intech press. Croácia. pp. 583-613 <http://dx.doi.org/10.5772/52212>

Austin AD, Johnson NF, Dowton M (2005) Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastid wasps. *Annu Rev Entomol* 50: 553-582.

Bernasconi ML, Turlings TCJ, Ambrosetti L, Bassetti P, Dorn S (1998) Herbivore-

induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. Entomol Exp Appl 87: 133-142.

Brandão AR, Barbosa HS, Arruda MAZ (2010) Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. J Proteomics 73(8): 1433-1440

Bruce TJ, Wadhams LJ, Woodcock CM (2005) Insect host location: a volatile situation. Trends Plant Sci. 10: 269-274

Bruce TJA, Midega CAO, Birkett MA, Pickett JA & Khan ZR (2010) Is quality more important than quantity? Insect behavioural responses to changes in a volatile blend after stemborer oviposition on an African grass. Biol Lett 6: 314-317.

Bruce TJA, Wadhams LJ, Woodcock CM (2005) Insect host location: a volatile situation. Trends Plant Sci 10: 269-274.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.

Bueno RCOF, Parra JRP, Bueno AF, Moscardi F, Oliveira JRG, Camillo MF (2007) Sem barreira. Rev Cultivar 93: 12-15

Campo CBH, Oliveira EB, Moscardi F (1985) Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Embrapa CNPSo 23p

Chapman RF (2003) Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. Annu Rev Entomol 48:455–84.

Chen Y, Schmelz EA, Wäckers F, Ruberson JR (2008) Cotton plant, *Gossypium hirsutum* L., defense in response to nitrogen fertilization. J Chem Ecol 34:1553–1564 doi:10.1007/s10886-008-9560-x

Clavijo McCormick AL, Unsicker S Gershenzon J (2012) The specificity of herbivore- induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. Trends Plant Sci., 17(5), 303- 310. doi:10.1016/j.tplants.2012.03.012.

Colazza S, Peri E, Salerno G, Conti E (2010) Host Searching by Egg Parasitoids: Exploitation of Host Chemical Cues. In: Consoli FL, Parra JRP, Zucchi R, editors. Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma. Dordrecht: Springer. 97-147.

Colazza S; Rossi MC; Clemente A (1997) Response of the egg parasitoid *Telenomus busseolae* (Gahan) to sex pheromone of *Sesamia nonagrioides* L (efebre). J Chem Ecol 23: 2437-2444.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento- Divulgação de safras 2015. Disponível em www.conab.gov.br. Acesso em 21/07/2015.

Corrêa-Ferreira B S (1980) Sampling *Epinotia aporema* on soybean. In: Kogan M, Herzog D C (Ed.). Sampling methods in soybean entomology. Springer-Verlag, 374-381.

Cruz I (1995) A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45p. (Circular Técnica 21).

Cruz I, Figueiredo M L C, Gonçalves E P, Lima D A N, Diniz E E (1997) Efeito da idade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no desempenho do parasitoide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e consumo foliar por lagartas parasitadas e não parasitadas. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 26(2): 229-234.

D'Alessandro M, Turlings TCJ (2006) In situ modification of herbivore-induced plant odors: a novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps. Chem Senses 30: 739-753.

- De Boer JG, Dicke M (2004) The role of methyl salicylate in prey searching behavior of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. *J Chem Ecol* 30: 255-271.
- De Jong R, Kaiser L (1991) Odor learning by *leptopilina boucardi* a specialist parasitoid hymenoptera eucoilidae. *J Insec Behav* (4) 743-750
- Dean JM, De Moraes CM (2006) Effects of genetic modification on herbivore-induced volatiles from maize. *J Chem Ecol* 32: 713–724
- Degen T, Dillmann C, Marion-Poll F, Turlings TCJ (2004) High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. *Plant Physiol* 135: 1928-1938
- Dicke M, Sabelis M W, Takabayashi J, Bruin J, Posthumus M A (1990) Plant strategies of manipulating predator–prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. *J Chem Ecol* 16: 3091–3118.
- Dicke M, van Loon JJA (2000) Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol Exp Appl* 97: 237-249.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7: 1085–1097.
- Drukker B, Bruin J, Sabelis MW (2000) Anthocorid predators learn to associate herbivore-induced plant volatiles with presence or absence of prey. *Physiol. Entomol.* 25: 260-265.
- Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I (2006) Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25:417-440.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* 135:1893–1902.
- Fatouros NE, Broekgaarden C, Bukovinszkyne' Kiss G, van Loon JJA, Mumm R,

Huigens ME, Dicke M, Hilker M (2008) Male-derived butterfly anti-aphrodisiac mediates induced indirect plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 10033-10038.

Fatouros NE, Bukovinszky G, Dicke M, Hilker M (2007) The response specificity of *Trichogramma* egg parasitoids towards infochemicals during host location. *J Insect Behav* 20: 53-65.

Fatouros NE, Dicke M, Mumm R, Meiners T, Hilker M (2008) Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. *Behav Ecol* 19: 677-689.

Fatouros NE, Lucas-Barbosa D, Weldegergis BT, Pashalidou FG, van Loon JJA, Dicke M, Harvey JA, Gols R, Huigens ME (2012) Plant volatiles induced by herbivore egg deposition affect insects of different trophic levels. *PLoS ONE* 7 (8): e43607.

Fatouros NE, Pashalidou FG, Cordero WVA, van Loon JJA, Mumm R (2009) Anti-aphrodisiac compounds of male butterflies increase the risk of egg parasitoid attack by inducing plant synomone production. *J Chem Ecol* 35:1373–1381.

Fehr W, Caviness C, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci* 11: 929-931

Ferry N, Gatehouse AMR (2009) Environmental impact of genetically modified crops, Cambridge, CABI International.

Food and Agriculture Organization (2011) Genetically modified crops. <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e04d.pdf> (Last Access September 4, 2014).

Fritzsche-Hoballah ME, Tamò C, Turlings TC (2002) Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? *J Chem Ecol* 28:951-68.

Garcia-Villalba R, Leon C, Dinelli G, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A, Garcia-Canas V (2008). Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1195(1-2): 164-173

Gassen D N (1996) Manejo de pragas associadas à cultura milho. Passo Fundo: Ideia Norte p. 85-104.

Gazit Y, Lewis WJ, Tumlinson JH (1996) Arrestment of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) by a kairomone associated with eggs of its host, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol Control* 6: 283–290.

Girling RD, Stewart-Jones A, Dherbecourt J, Staley JT, Wright DJ, Poppy GM (2011) Parasitoids select plants more heavily infested with their caterpillar hosts: a new approach to aid interpretation of plant headspace volatiles. *Proc. R. Soc. B.* 278, 2646– 2653.

Glinwood R, Ahmed E, Qvarfordt E, Ninkovic V (2011) Olfactory learning of plant genotypes by a polyphagous insect predator. *Oecologia* 166: 637–647

Gouinguéné SP, Städler E (2006) Oviposition in *Delia platura* (Diptera, Anthomyiidae): the role of volatile and contact cues of bean. *J Chem Ecol* 32: 1399-1413.

Graham R D, Webb M J (1991) Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: Mortwedt J J, Cox F R, Shuman L M, Welch R M (Eds). *Micronutrients in agriculture*. Madison: Soil Science Society of America, Inc. p.329-370.

Haji F N P, Freire L C L, Roa F G, Silva C N, Souza Junior M M, Silva M I V (1995) Manejo integrado de *Scrobipalpuloides absoluta* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) no Submédio São Francisco. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 24(3): 587- 591.

Hare JD (2011) Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annu Rev Entomol* 56: 161-180

Hermann KM, Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 473–503

Hilker M, Kobs C, Varama M, Scrank K (2002) Insect egg deposition induces *Pinus* to attract egg parasitoids. *The J Exp Biol* 205: 455-461.

Himanen SJ, Nerg AM, Nissinen A, Pinto DM, Stewart CN Jr, Poppy GM, Holopainen JK (2009) Effects of elevated carbon dioxide and ozone on volatile terpenoid emissions and multitrophic communication of transgenic insecticidal oilseed rape (*Brassica napus*). *New Phytol* 181: 174-186.

Horiuchi JI, Arimura GI, Ozawa R (2003) A comparison of the responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to volatiles emitted from lima bean leaves with different levels of damage made by *T. urticae* or *Spodoptera exigua* (Lepidoptera). *Appl Entomol and Zool* 38: 109-116.

Kaplan I (2012) Trophic complexity and the adaptive value of damage-induced plant volatiles. *PLOS Biol* 10(11): e1001437

Kappers IF, Aharoni A, van Herpen TWJM, Luckerhoff LLP, Dicke M, Bouwmeester HJ (2005) Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science* 309: 2070–2072

Kappers IF, Hoogerbrugge H, Bouwmeester HJ, Dicke M (2011) Variation in herbivory-induced volatiles among cucumber (*Cucumis sativus* L.) varieties has consequences for the attraction of carnivorous natural enemies. *J Chem Ecol* 37: 150–160

Karban R, Baldwin IT (1997) *Induced Responses to Herbivory*. University of

Chicago Press, Chicago.

Kariyat R R , Mauck K, De Moraes CM, Stephenson AG, Mescher MC (2012) Inbreeding alters volatile signaling phenotypes and influences tritrophic interactions in horsenettle (*Solanum carolinense* L.) *Ecol Lett* 15: 301-309

Khan ZR, Midega CAO, Njuguna EM, Arnudavi DM, Wanyama JM, Pickett JA (2008) Economic performance of the 'push-pull' technology for stemborer and Striga control in smallholder farming systems in western Kenya. *Crop Prot* 27: 1084-1097.

Khan ZR, Midega CAO, Njuguna EM, Arnudavi DM, Wanyama JM, Pickett JA (2008) Economic performance of the 'push-pull' technology for stemborer and Striga control in smallholder farming systems in western Kenya. *Crop Prot* 27: 1084-1097.

Landolt PJ, Tumlinson JH, Alborn DH (1999) Attraction of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to damaged and chemically induced potato plants. *Environ Entomol* 28: 973-978.

Lewis WJ, Nordlund D A (1985) Behavior-modifying chemicals to enhance natural enemy effectiveness. In: Hoy MA, Herzog DC (eds), *Biological control in agricultural IPM systems*. Academic Press, Orlando, pp. 89-101.

Luginbill P (1928) The fall armyworm. *Tech Bull US Depart Agric* 34: 1-91.

Maeda H, Dudareva N (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Ann Rev Plant Biol* 63: 73-105.

Meiners T, Hilker M (2000) Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. *J Chem Ecol* 26: 221-232.

Mérey G, Veyrat N, Mahuku G, Valdez R L, Turlings T C J, D'Alessandro M (2011) Dispensing synthetic green leaf volatiles in maize fields increases the release of sesquiterpenes by the plants, but has little effect on the attraction of pest and beneficial insects. *Phytochem* 72: 1838.

Milonas PG, Mazomenos BE, Konstantopoulou MA (2009) Kairomonal effect of sex pheromone components of two lepidopteran olive pests on *Trichogramma* wasps. *Insect Sci* 16:131-136.

Mithöfer A, Boland W (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 431-450

Moraes RR, Loeck A E, Belarmino L C (1991) Inimigos naturais de *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) e de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em soja no Rio Grande do Sul. *Pesq Agropec Brasil* 26:57-64.

Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffman-Campo CB, Pomari AF, Corso IV, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffman- Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (Ed.). Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa, pp. 213-309.

Moscardi F, Sosa-Gómez DR (1992) Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: Copping IG, Green MB, Reeds RT (Eds.). Pest management in soybean. London: Elsevier Applied Science, pp. 98-109.

Mumm R, Tiemann T, Varama M, Hilker M (2005) Choosy egg parasitoids: Specificity of oviposition-induced pine volatiles exploited by an egg parasitoid of pine sawflies. *Entomol Exp et Appl* 115: 217-225.

Ngumbi E, Jordan M, Fadamiro H (2012). Comparison of associative learning of host- related plant volatiles in two parasitoids with different degrees of host specificity, *Cotesia marginiventris* and *Microplitis croceipes*. *Chemoecol* 22 (4): 207-215

Noldus LPJJ (1989) Response of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* to the sex pheromone of its host *Heliothis zea*. *Entomol Exp Appl* 48: 293-300.

Noldus LPJJ, Potting RPJ, Barendregt HE (1991) Moth sex pheromone adsorption to leaf surface: bridge in time for chemical spies. *Physiol Entomol* 16: 329-344.

Noldus LPJJ, van Lenteren JC (1985) Kairomones for the egg parasite *Trichogramma evanescens* Westwood. Effect of volatile substances released by two of its hosts, *Pieris brassicae* L. and *Mamestra brassicae* L. *J Chem Ecol* 11: 781-791.

Orr DB, Russin JS, Boethel DJ (1986) Reproductive biology and behavior of *Telenomus calvus* (Hymenoptera: Scelionidae), a phoretic egg parasitoid of *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Canadian Entomologist* 118: 1063-72.

Parker FD, Lawson FR, Pinnell, RE (1971) Suppression of *Pieris rapae* using a new control system: Mass release of both the pest and its parasitoids. *J Econ Entomol* 64: 721-735.

ParkS-W; Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113-116.

Parra JRP (2001) Técnicas de Criação de Insetos para Programas de Controle Biológico. FEALQ, Piracicaba.

Parra JRP (2001) Técnicas de Criação de Insetos para Programas de Controle Biológico. FEALQ, Piracicaba

Penaflor MFGV, Erb M, Robert CAM, Miranda LA, Werneburg AG (2011) Oviposition by a moth suppresses constitutive and herbivore-induced plant volatiles in maize. *Planta* 234: 207-215.

Pichersky E, Gershenzon J (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Op Plant Biol* 5: 237-243.

Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1997) Developing sustainable pest control from chemical ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 64:149-156.

Pinto J D (1999) Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Washington: Entomolog Soc Washington, 287p.

Pinto-Zevallos DM, Hellén H, Hakola H, van Nouhuys S, Holopainen JK (2013) Induced defenses of *Veronica spicata*: variability in herbivore-induced volatile organic compounds. *Phytochem Lett* 6: 653-656.

Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Miyakubo SH, de Oliveira MC (2005) Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? *J Chem Ecol* 31:1509-25.

Pogue G M (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem Am Entomol Soc* 43: 1-202.

Powell W (1999) Parasitoid hosts. In: Hardie J, Minks AK (eds) *Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 405- 27.

Proffit M, Birgersson G, Bengtsson M, Reis R, Jr., Witzgall P, Lima E (2011). Attraction and oviposition of *Tuta absoluta* females in response to tomato leaf volatiles. *J Chem Ecol* 37: 565-574.

Raguso RA (2004) Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrance-driven pollination. In: Cardé RT, Millar JG (eds) *Advances in Insect Chemical Ecology*. University Press, Cambridge, pp 151-178.

Rostás M, Eggert K (2008) Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis. *Chemoecology* 18: 29 – 38.

Saini E D (1994) Aspectos morfológicos y biológicos de *Podisus connexivus* Bergroth (Heteroptera: Pentatomidae). *Rev Soc Entomol Argentina* 53: 35-42.

Sant'ana J, Dickens JC (1998) Comparative electrophysiological studies of olfaction in predaceous bugs, *Podisus maculiventris* and *P. nigrispinus*. *J Chem Ecol* 24: 965-984.

Schoonhoven LM, van Loon JJ, Dicke M (2006) *Insect-Plant Biology*. University Press, Oxford.

Schröder R, Forstreuter M, Hilker M (2005) A plant notices insect egg deposition and changes its rate of photosynthesis. *Plant Physiol* 138: 470-477.

Schuler, T. H., R. P. Potting, Denholm I, Poppy GM (1999) Parasitoid behaviour and Bt plants. *Nature* 400: 825-829

Shiojiri, K., Ozawa, R., Matsui, K., Sabelis, M.W. and Takabayashi, J. (2012) Intermittent exposure to traces of green leaf volatiles triggers a plant response. *Sci. Rep.* 2: 378. doi: 10.1038/srep00378

Sosa-Gómez DR, Delpin KE, Moscardi F, Nozaki MH (2003) The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. *Neotr Entomol* 32(2): 287- 291.

Stinner BR, House GJ (1990) Arthropods and other invertebrates in conservation-tillage agriculture. *An Rev Entomol* 35: 299-318.

Strack D (1997) Phenolic metabolism In: Dey PM, Harborne JB (eds) *Plant Biochemistry*. London: Academic press, pp. 387-416.

Tamiru A, Bruce TJ, Midega CA, Woodcock CM, Birkett MA (2012) Oviposition induced volatile emissions from African smallholder farmers' maize varieties. *J Chem Ecol* 38: 231-234.

Tamiru A, Bruce TJA, Woodcock CM, Caulfield JC, Midega CAO (2011) Maize landraces recruit egg and larval parasitoids in response to egg deposition by a herbivore. *Ecol Lett* 14: 1075-1083.

Thaler J S, Humphrey P T, Whiteman N K (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* 17: 260–270.

Ton J, D'Alessandro M, Jourdie V, Jakab G, Karlen D, Held M, Mauch-Mani B, Turlings TC (2006) Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J* 49: 16-26.

Tooker JF, De Moraes CM (2005) Jasmonate in Lepidoptera eggs and neonates. *J Chem Ecol* 31: 2753-2759.

Torres JB, Zanuncio JC, Moura MA (2006) The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in *Eucalyptus* forests in Brazil. *CAB Reviews: Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat* 15: 1-17.

Turlings TC, Jeanbourquin PM, Held M, Degen T (2005) Evaluating the induced-odour emission of a Bt maize and its attractiveness to parasitic wasps. *Transgenic Res* 14: 807- 816.

Turlings TCJ, Ton J (2006) Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odors to enhance the control of agricultural pests. *Curr Opin Plant Biol* 9: 421–427

Turlings TCJ, Wäckers FL (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-damaged plants. In: Cardé RT, Millar J (eds) *Advances in Insect Chemical Ecology*. University Press, Cambridge, pp 21-75.

Valicente F H e Fonseca M M (2004) Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. *Revista*

Brasileira de Milho e Sorgo 3(1): 21-29.

Van Poecke RMP, Dicke M (2002) Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. J Exp Bot 53: 1793-1799.

Velikova V, Salerno G, Frati F, Peri E, Conti E, et al. (2010) Influence of feeding and oviposition by phytophagous pentatomids on photosynthesis of herbaceous plants. J Chem Ecol 36: 629-641.

Vet LEM, Dicke M (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. Annual Review of Entomology 37: 141-172.

Vinson SB (1984) How parasitoids locate their hosts: a case of insect espionage. In: Lewis T (ed) Insect Communication. Academic Press, London, pp. 325-48.

Vinson SB (2010) Nutritional ecology of insect egg parasitoids. In: Consôli FL, Parra JRP, Zucchi R (eds) Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*. Springer, Dordrecht, pp. 25-55.

Vogler U, Rott AS, Gessler C, Dorn S (2009) Terpene-mediated parasitoid host location behavior on transgenic and classically bred apple genotypes. J Agric Food Chem 57: 6630-6635.

Vogler U, Rott AS, Gessler C, Dorn S (2010) Comparison between volatile emissions from transgenic apples and from two representative classically bred apple cultivars. Transgenic Res 19: 77-89.

Walling LL (2000) The myriad plant responses to herbivores. J Plant Growth Regul 10: 195-216

Xu W H, Liu B, Wang R M, Zheng Y P, Zhang Y, Li X G (2008) Effects of transgenic *Bt* cotton on insect community in cotton fields of coastal agricultural area of Jiangsu province. J Ecol and Rural Envir 24: 32-38.

Yan F, Bengtsson M, Anderson P, Ansebo L, Xu C, Witzgall P (2004) Antennal response of cotton bollworm (*Helioverpa armigera*) to volatiles in transgenic Bt cotton. J Appl Entomol 128: 354-357.

Yu XD, Pickett J, Ma YZ, Bruce T, Napier J, Jones HD (2012) Metabolic engineering of plant-derived (*E*)-b-farnesene synthase genes for a novel type of aphid-resistant genetically modified crop plants. J Integr Plant Biol 54: 282–299.

Zaki F N, Awadallah K T, Gesraha M A, Ibrahim M M A (1995) Attractiveness of the parasitoid, *Meteorus rubens* (nees) to hexane-extract of *Agrotis ipsilon* (hufn.). J Insec Pest 68 (6): 140-141.

Zanuncio J C, Torres J B, Bernardo D L, De Clercq P (1997) Effects of prey switching on nymphal development of four species of predatory stinkbugs. Med Fac Landbouww Univ Gent 62: 483-490.

Zhu J, Park K C (2005). Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. J Chem Ecol 31:1733-1746.

Zobiole, LHS, Bonini EA, Oliveira-Junior RS, Kremer RJ, Ferrarese-Filho O (2010) Glyphosate affects lignin content and amino acid production in glyphosate-resistant soybean. Acta Physiol Plant. 32:831-837.

Zonetti PC, Suzuki LS, Bonini EA, Ferrarese MLC, Ferrarese-Filho O (2012) High Temperatures on root growth and lignifications of transgenic-resistant soybean. Agrociencia 46: 557-565